

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ANÁLISIS GENÉTICO DE LA FOSFATASA CDC14B EN
MAMÍFEROS

TESIS DOCTORAL

MARIA GUILLAMOT RUANO

Madrid, 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Análisis genético de la fosfatasa Cdc14b en mamíferos

María Guillaumot Ruano

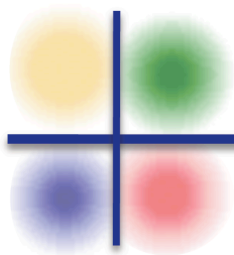
Licenciada en Farmacia

Director: Marcos Malumbres Martínez

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, 2011

A mis padres, a mis hermanos y a Chebi.



Resumen

RESUMEN

En levaduras, Cdc14 es la fosfatasa que regula la desfosforilación de los sustratos de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) promoviendo la salida de mitosis. A pesar de la elevada homología estructural de sus ortólogos, Cdc14a y Cdc14b, las funciones de estas fosfatasas en mamíferos son desconocidas. La generación de un modelo de ratón condicionalmente deficiente en Cdc14b nos ha permitido determinar la dispensabilidad de dicha fosfatasa en la división celular. Sin embargo, los fibroblastos deficientes en Cdc14b presentan una transición en G1/S prematura. Si bien, la eliminación de este gen no genera ninguna anomalía en el desarrollo de los ratones, la ausencia de Cdc14b induce una mayor susceptibilidad al desarrollo tumorigénico *in vivo*. Además, estos ratones presentan oligoastenoteraozoospermia. Este hecho nos ha permitido identificar dos nuevas funciones de esta fosfatasa en la formación de los espermatozoides. En primer lugar, Cdc14b es esencial en el punto de control del paquiteno y en segundo lugar, esta fosfatasa regula la maduración de las espermátidas al modular el acoplamiento cabeza-cola de los espermatozoides maduros.

SUMMARY

In yeast, Cdc14 promotes mitotic exit by dephosphorylating Cyclin-dependent kinase (Cdk) substrates. Despite the high homology between the yeast Cdc14 and its mammalian orthologs, Cdc14a and Cdc14b, their functions are unknown. We have determined the dispensability of Cdc14b in mitotic exit by the generation of a mouse model with a conditional knock out mutation in the corresponding gene. Surprisingly Cdc14b-null fibroblast display a premature G1/S transition. Although the ablation of this gene does not induce development defects, lack of Cdc14b results in increased susceptibility to tumor development *in vivo*. In addition, these mice show oligoteratoasthenozoospermia. We have identify in this study two new roles of this phosphatase in sperm maturation. First, Cdc14b is a essential for pachytene checkpoint. Second, Cdc14b regulates spermatid maturation by the modulation of the proper connections between the head and the tail of the mature spermatozoa.

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas	5
INTRODUCCIÓN	11
1. El ciclo celular	11
1.1. Control del ciclo celular	12
1.2. Mecanismos moleculares del ciclo celular	13
2. La mitosis	15
2.1. Etapas de la mitosis	16
2.2. Mecanismos moleculares de la mitosis	17
2.2.1. Entrada en mitosis y progresión hasta metafase	17
2.2.2. Transición metafase-anafase y salida de mitosis	18
2.2.3. Importancia de la desfosforilación en la salida de mitosis	19
3. Familia de las fosfatasa Cdc14	21
4. La meiosis	23
4.1. Etapas de la meiosis.....	23
4.2. Mecanismos moleculares de la meiosis	24
4.3. Punto de control del paquiteno	27
5. La espermatogénesis	29
OBJETIVOS	33

MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Ratones modificados genéticamente	37
1.1. Generación del vector Knock out condicional para Cdc14b	37
1.2. Generación de las quimeras mutantes para Cdc14b	37
1.3. Análisis de genotipos.....	38
1.4. Tratamientos y procedimientos	38
3.1.1. Tratamiento con DMBA	39
3.1.2. Tratamiento con DMBA-TPA	39
3.1.3. Cuantificación de xenotransplantes.....	40
3.1.4. Análisis histológico e inmunohistoquímico	40
3.1.5. Obtención de células espermátogenas: esparcidos y aplastados	40
3.1.6. Cuantificación y obtención de espermatozoides	41
2. Inducción de xenotransplantes en embriones de pollo	42
3. Cultivos celulares	42
3.1. Cultivo de MEFs	42
3.1.1. Curva de crecimiento	43
3.1.2. Sincronización en G0	43
3.1.3. Citometría de flujo	43
3.1.4. Nucleofección y videomicroscopia	44
3.2. Cultivo de células NIH3T3	44
3.1.5. Ensayo de focos	44
3.1.6. Generación de clones estables	44
3.1.7. Ensayo de colonias en soft-agar	45
3.1.8. Estudio de motilidad	45
3.1.9. Ensayo de heridas	45
4. Procedimientos bioquímicos	46
4.1. Western blot	46

4.2. Inmunofluorescencias	46
5. Microscopía electrónica	47
6. Generación de plásmidos	48
RESULTADOS	53
1. Generación de un modelo de ratón deficiente en Cdc14b	53
2. Estudio del desarrollo y de la tumorigénesis en los ratones deficientes en Cdc14b	54
2.1. Cdc14b es dispensable en el desarrollo murino	57
2.2. La ausencia de Cdc14b incrementa la susceptibilidad a desarrollar tumores espontáneos de larga latencia	57
2.3. Los ratones deficientes en Cdc14b presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores inducidos por tratamientos carcinogénicos	59
3. Implicación de Cdc14b en la progresión del ciclo celular	60
3.1. Cdc14b es dispensable en la mitosis de las células de mamíferos	60
3.2. La ausencia de Cdc14b induce entrada en mitosis prematura	63
3.3. Las células deficientes en Cdc14b entran en fase S prematuramente	64
4. La sobreexpresión de Cdc14b induce la transformación oncogénica	66
4.1. La sobreexpresión de Cdc14b induce alteraciones en la motilidad	70
4.2. La inhibición de la ruta de las quinasas MEK/ERK revierte el fenotipo de las células que sobreexpresan Cdc14b	73
4.3. El análisis de expresión de genes por microarrays revela elevadas similitudes entre las células que sobreexpresan Cdc14b y las que sobreexpresan H-Ras.	75
5. La ausencia de Cdc14b induce esterilidad en los ratones machos	76
5.1. Estudio histopatológico de los testículos de ratones deficientes en Cdc14b ...	76

5.2. Los espermatoцитos primarios deficientes en Cdc14b presentan una meiosis I defectuosa	77
5.3. La fosfatasa Cdc14b es necesaria para el control del paquiteno	83
5.4. La fosfatasa Cdc14b es esencial en la espermiogénesis	87
DISCUSIÓN	95
1. ¿Ha conservado Cdc14b sus funciones en la evolución?	96
2. Implicación de Cdc14b en el ciclo celular	97
3. Cdc14b en la transformación oncogénica	99
4. Cdc14b en la espermatogénesis	100
4.1. Causas y consecuencias de la presencia de los cromosomas XY univalentes	100
4.2. Cdc14b y el punto de control del paquiteno	103
4.3. Dimorfismo sexual en la fertilidad de los ratones deficientes en Cdc14b	106
4.4. ¿Es Cdc14b esencial en la espermiogénesis?	108
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXOS	125

TABLA DE ABREVIATURAS

AAM	<u>A</u> croplaxoma- <u>A</u> xoma- <u>M</u> anchette
Ab:	Anticuerpo (<u>A</u> nti <u>b</u> ody)
APC/C	Complejo promotor de la anafase ó ciclosoma (<u>A</u> naphase <u>P</u> romoting <u>C</u> omplex or <u>C</u> yclosome)
Cdk:	Quinasa dependiente de ciclina (<u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase)
cDNA:	DNA complementario
CKI:	Inhibidores de Cdks (<u>C</u> dk <u>I</u> nhibitor)
CNIO:	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol (4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole)
DDR	Ruta de reparación del daño al DNA (<u>D</u> NA <u>D</u> amage <u>R</u> epair)
DMBA:	Dimetilbenzantraceno
DMEM:	Medio mínimo esencial de Dulbecco (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium)
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DTT:	Ditiotreitol
EdU:	5-etinil-2'-deoxiuridina
EA	<u>E</u> lemento <u>A</u> xial
EC	<u>E</u> lemento <u>C</u> entral
EL	<u>E</u> lemento <u>L</u> ateral
ES:	Células embrionarias madre (<u>E</u> mbryonic <u>S</u> tem cell)
EV	Vector vacío (<u>E</u> mpy <u>V</u> ector)
FBS:	Suero fetal bovino (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
FEAR	Liberación temprana de Cdc14 (Cdc <u>F</u> ourteen <u>E</u> arly <u>A</u> naphase <u>R</u> elease)
Flp:	Recombinasa Flp
G0	<u>G</u> ap <u>0</u>
G1	<u>G</u> ap <u>1</u>
G2	<u>G</u> ap <u>2</u>
G418	Geneticina

GFP:	Proteína verde fluorescente (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
H3-K9-tri-m	Histona-H3-Lisina-9-trimetilada
HTCA	Aparato acoplador cabeza-cola (<u>H</u> ead- <u>T</u> ail <u>C</u> oupling <u>A</u> pparatus)
H&E:	Hematoxilina y eosina
IF:	Inmunofluorescencia
IHQ:	Inmunohistoquímica
IP:	Inmunoprecipitación
iRNA	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleico de <u>i</u> nterferencia
KO:	Knock-out
M:	Fase de <u>M</u> itosis
MEFs:	Fibroblastos embrionarios de ratón (<u>M</u> ouse <u>E</u> mbryonic <u>F</u> ibroblast)
MEN	Ruta de salida de mitosis (<u>M</u> itotic <u>E</u> xit <u>N</u> etwork)
MPF:	Complejo promotor de la fase M (<u>M</u> itotic <u>P</u> romoting <u>F</u> actor)
MSCI	Inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (<u>M</u> eiotic <u>S</u> ex <u>C</u> hromosomes <u>I</u> nactivation)
MSE	Elemento medio de esporulación (<u>M</u> iddel <u>S</u> porulation <u>E</u> lement)
MSUC	Silenciamiento meiótico de la cromatina no sinaptada (<u>M</u> eiotic <u>S</u> ilencing of <u>U</u> nsynapsed <u>C</u> hromatin)
Neo:	Neomicina
Noc:	Nocodazol
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Fosfatasa inactiva (<u>P</u> hosphatase <u>D</u> ead)
PH3:	Fosfo-histona H3
Plk1:	Polo quinasa-1 (<u>P</u> olo <u>l</u> ike <u>k</u> inase- <u>1</u>)
PP1:	Fosfatasa PP1 (<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>1</u>)
PP2A:	Fosfatasa PP2A (<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u>)
pRb:	Retinoblastoma
rDNA	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico <u>r</u> ibosómico
RH	<u>R</u> ecombinación <u>H</u> omóloga
S	Fase de <u>S</u> íntesis o duplicación del DNA
SAC:	Punto de control de unión al huso (<u>S</u> pindle <u>A</u> ssembly <u>C</u> heckpoint)
SCID:	Ratones con deficiencia inmunitaria severa (<u>S</u> evere <u>C</u> ombined <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

siRNA: RNA de interferencia (Small Interference RNA)

T: Telofase

TPA: Tetradecanoforbol acetato

T.U.N.E.L. TdT mediated dUTP Nick End Labelling

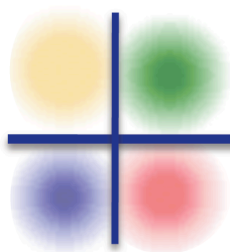
WB: Transferencia de proteínas a membrana (Western Blot)

WT: Animal de genotipo salvaje (Wild Type)

X: Xenopus

14B Cdc14b

14A Cdc14a



Introducción

INTRODUCCIÓN

La Teoría celular enunciada y altamente debatida a lo largo del siglo XIX pone de manifiesto que todos los seres vivos están formados por células y que toda célula proviene de la división de otra célula: "*Omnis cellula e cellula*". A principios del siglo XX, el redescubrimiento de las leyes de *Mendel*, abre paso al desarrollo de la Genética y emergen los conceptos de genes y de herencia. En 1953 *Watson* y *Crick* describen la estructura del DNA y cinco años más tarde se enuncia el "dogma central de la biología molecular" que integra los conceptos centrales de duplicación, transcripción y traducción. Es el nacimiento de la Biología molecular, ciencia que busca el entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula y de cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir su correcto funcionamiento. Si bien los organismos superiores procedemos de una sola célula madre inicial y de un continuo proceso proliferativo, es fácil advertir la importancia de que el ciclo de división celular sea altamente preciso y exacto. En el año 2001, *Leland H. Hartwell*, *Tim Hunt* y *Sir Paul M. Nurse* recibieron el Premio Nobel de Medicina "por el descubrimiento de las claves reguladoras del ciclo celular". No cabe duda de que el entendimiento de los mecanismos que regulan el ciclo celular y la preservación de la integridad genómica es fundamental para llegar a comprender las alteraciones responsables de anomalías en el desarrollo embrionario o en patologías proliferativas como el cáncer.

1. El ciclo celular.

El ciclo celular consiste en una serie de eventos coordinados que permiten el crecimiento y la proliferación celular. Se trata del proceso por el cual una célula madre se divide en dos células hijas genéticamente idénticas. Este proceso se divide en cuatro fases sucesivas: G1, S, G2 y M. Durante la fase de *Síntesis* o S la célula duplica su DNA generando una copia idéntica de su material genético. Posteriormente, durante la *Mitosis* o fase M tiene lugar la segregación equitativa de los cromosomas entre las dos células hijas. Las otras dos fases del ciclo, *Gap 1* (G1) y *Gap 2* (G2), representan periodos de espera que permiten a la célula prepararse para completar con éxito

las fases S y M. La mayor parte de las células de un organismo son células diferenciadas y altamente especializadas, que se encuentran en una fase de quiescencia o fase G₀ fuera del ciclo celular. Tan sólo, ante un estímulo mitogénico algunas de estas células abandonan su estado de reposo y entran en el ciclo celular.

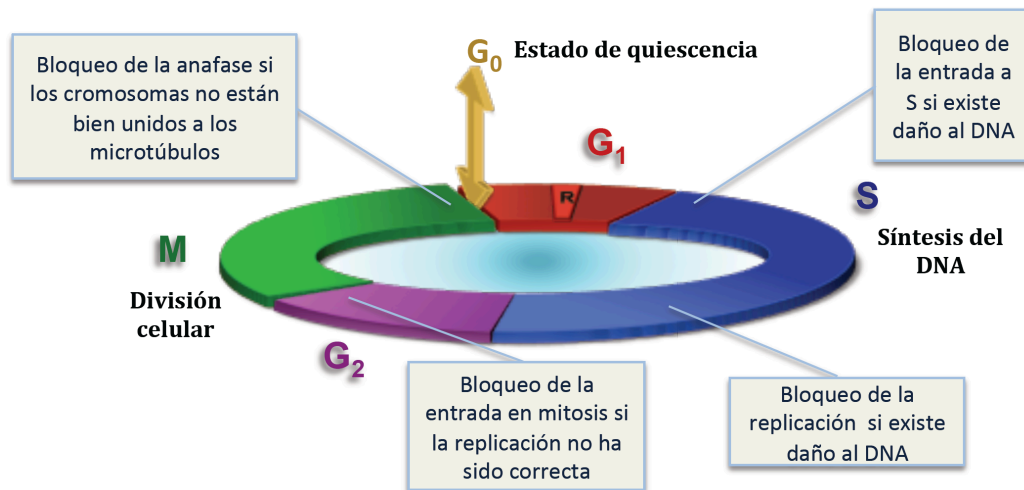


Figura 1. Ciclo celular. Los estímulos mitogénicos inducen la entrada en el ciclo celular. Durante la fase de síntesis el DNA se duplica y posteriormente en mitosis la célula se divide dando lugar a dos células hijas genéticamente idénticas. La correcta progresión por el ciclo celular requiere de determinados puntos de control que evalúan si el proceso está transcurriendo adecuadamente antes de permitir la entrada en la fase siguiente.

1.1. Control del ciclo celular y cáncer.

Las células eucariotas han desarrollado una serie de mecanismos de control que aseguran la transición lineal y ordenada a través de las distintas fases del ciclo celular, garantizando la integridad del genoma y la viabilidad celular. Son los llamados Puntos de control o *Checkpoints* (Hartwell and Weinert 1989), los cuales actúan como interruptores bioquímicos verificando que cada fase del ciclo se ha completado correctamente antes de permitir la entrada en la fase siguiente. El fallo en la regulación de estos mecanismos puede provocar alteraciones en el DNA, las cuales podrían degenerar en el desarrollo de procesos tumorales.

El primer punto de control es la propia decisión de entrada en el ciclo celular. Ésta depende de las señales mitógenicas que indiquen a la célula la necesidad de dividirse (Malumbres and Barbacid 2001) y de que la célula reúna las características adecuadas para ello. Durante G₁ la célula evalúa continuamente todos estos parámetros hasta que alcanza el **Punto de restricción R** (Pardee 1974), un punto de no retorno, tras el cual se asume que todas estas señales son correctas

y que la célula está preparada para continuar con un ciclo de división. Frecuentemente, las células tumorales adquieren autonomía frente a las señales de crecimiento del medio, a lo que se denomina capacidad de proliferación no programada (Malumbres and Barbacid 2001). El segundo punto de control es el punto de control del daño al DNA, que actúa tanto en G1, S o G2. Éste protege a la célula de alteraciones genómicas provocadas por agentes genotóxicos o incluso por problemas en el mismo proceso de duplicación, asegurando la integridad del genoma. La inestabilidad genómica o el incremento en la tasa de mutación del DNA se deben a anomalías en este *checkpoint*. Una vez el DNA se ha replicado correctamente, los cromosomas deben segregarse equitativamente. El último punto de control del ciclo celular es el llamado Punto de control de la unión al huso acromático (*Spindle Assembly Checkpoint*, SAC), el cual regula que la transición metafase-anafase tenga lugar solo cuando todos los cromosomas se encuentran bien alineados en la placa metafásica con sus cinetocoros perfectamente unidos a los microtúbulos del huso mitótico. Los defectos en el SAC conllevan a una segregación de cromosomas no equitativa, generándose células hijas aneuploides. La inestabilidad cromosómica o la tendencia del genoma a adquirir un número de cromosomas aberrante es una característica frecuente en las células tumorales (Albertson et al. 2003; Kops et al. 2005; Perez de Castro et al. 2007). Siendo el desequilibrio en la proliferación y homeostasis celular características de la progresión tumoral, la implicación de reguladores del ciclo celular en cáncer ha sido ampliamente caracterizada en los últimos años (Malumbres and Carnero 2003). La proliferación no programada, la inestabilidad genómica y la inestabilidad cromosómica no solo originan una mayor ventaja proliferativa en las células, sino que además favorecen una mayor susceptibilidad de las células a adquirir alteraciones genéticas adicionales que se van acumulando confiriéndolas un fenotipo cada vez más agresivo.

1.2. Mecanismos moleculares del ciclo celular.

Desde el punto de vista molecular, la transición por el ciclo celular está controlada mediante la activación progresiva de diversas enzimas entre las que destaca la familia de las *Quinasas dependientes de ciclinas* o *Cdks* (*Cyclin-dependent kinases*). Se trata de serín-treonín quinasas, enzimas heterodiméricas constituidas por una subunidad proteica con actividad quinasa y una subunidad activadora llamada ciclina, cuyos niveles oscilan a lo largo del ciclo celular (Evans et al. 1983). Así pues, es la expresión consecutiva de las diversas ciclinas la que conlleva a una activación progresiva y cíclica de las diversas Cdks, las cuales monitorizan el ciclo a través de la fosforilación de sus diversos sustratos. Este proceso, descrito así de manera muy sencilla, es

altamente complejo, pues existen otros factores que contribuyen a la regulación de las Cdk como su inhibición por fosforilación o por su unión a determinados inhibidores (CKIs) y su activación mediante la fosforilación de uno de sus residuos por una quinasa activadora de ciclinas.

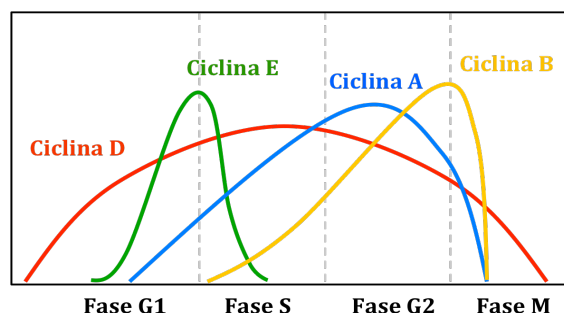
TABLA 1. Principales complejos ciclina-Cdk que regulan el ciclo celular

Ciclina	Cdk	Fase	Función
Ciclinas D	Cdk4 Cdk6	G1	Sensores mitogénicos. Sus niveles se elevan en G1 y permanecen elevados durante todo el ciclo. Fosforila pRb.
Ciclinas E	Cdk2	G1/S	Transición G1/S. Promueve la progresión hacia la duplicación del DNA y el inicio de la duplicación. Hiperfosforilación de pRb.
Ciclinas A	Cdk2 y Cdk1	S	Promueve la progresión de la fase S y la salida de ésta. Fosforilación de factores de transcripción, proteínas relacionadas con la duplicación (Cdc6, MCM4...), con la reparación del DNA (BRCA1, BRCA2...), proteínas de control del ciclo celular (p53, p21 ^{Cip1})
Ciclina B	Cdk1	M	Promueve la entrada en mitosis y progresión profase-metafase: regulación de la topoisomerasa II, condensación de cromatina, ruptura de la envuelta nuclear. Fosforila múltiples proteínas mitóticas: histonas, lamininas, subunidades del APC, Cdc25, dineínas...

Al inicio del ciclo celular, las señales mitogénicas inducen la expresión de las ciclinas D que se unen a Cdk4 y Cdk6. Estos complejos se translocan al interior del núcleo donde entre otros, fosforilan e inhiben parcialmente la familia de proteínas de retinoblastoma. Durante G0, Retinoblastoma (pRb) se encuentra activa formando complejos con factores de transcripción como E2F, impidiendo la expresión de muchos genes necesarios para la división celular. La hipofosforilación de pRb permite la expresión de genes como las ciclinas E. Éstas se unen a Cdk2 y regulan la transición G1/S al hiperfosforilar e inactivar por completo a pRb. La liberación completa del factor de transcripción E2F permite la expresión de multitud de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular como algunas proteínas necesarias para la síntesis del DNA, la transcripción, la mitosis... Una vez iniciada la duplicación, los complejos Ciclina E-Cdk2 se inactivan y Cdk2 se une a ciclina A para fosforilar múltiples proteínas necesarias para la completa finalización de la fase S. Al final de la fase S, Cdk1 también se une a la ciclina A participando en la fosforilación de sustratos relacionados con el ciclo celular. Durante G2, Cdk1 se une preferentemente a las Ciclinas B1 y B2. Estos complejos regulan la transición G2/M y la progresión hacia la fase final; la mitosis.

Si bien los complejos ciclina-Cdks son los motores que hacen que la célula progrese por el ciclo celular, a medida que el ciclo avanza es necesaria la síntesis de las proteínas implicadas en cada una de sus fases y es necesaria la degradación de muchas de ellas cuando han finalizado su función. Por ello, la transcripción proteica y la proteólisis también intervienen en la regulación del ciclo celular. El mecanismo de degradación que opera durante el ciclo celular es la proteólisis mediada por ubiquitinación. Las ubiquitin-ligasas actúan transfiriendo cadenas de ubiquitina a sus sustratos, de manera que éstos son reconocidos por el proteosoma y degradados. Existen principalmente dos complejos ubiquitin-ligasa que regulan el ciclo celular; SCF que promueve la degradación de las ciclinas E y algunos CKIs que controlan el inicio de la duplicación y el *Complejo promotor de la anafase* (*Anaphase Promoting Complex, APC*) que regula la transición metafase-anafase, la salida de mitosis y G1 (Nakayama and Nakayama 2006; Peters 2006; Sullivan and Morgan 2007).

Figura 2. Fluctuaciones en los niveles de las ciclinas. Los niveles de ciclinas fluctúan a lo largo del ciclo celular. En primer lugar, las señales mitógenas inducen la expresión de ciclinas D y la entrada en el ciclo. A partir de este momento las otras ciclinas (E, A y B) se van expresando y degradando progresivamente, monitorizando el avance por el ciclo celular



2. La mitosis.

La mitosis (del griego *mitos*, hebra) es la etapa final del ciclo celular en la cual el material genético, duplicado en la fase S, es repartido equitativamente entre las dos células hijas. El término fue acuñado por Walther Flemming en 1882, cuando basándose en sus observaciones describió la metamorfosis del núcleo que conllevaba a su división. El objetivo de la mitosis es distribuir el material genético duplicado en la fase S, con el fin de que cada una de las células hijas reciba una copia idéntica del genoma de su célula madre. Se trata, por tanto, de un proceso que requiere elevada precisión. Para llevarlo a cabo, a medida que el material genético se duplica, los complejos de cohesinas se disponen a lo largo del DNA para mantener las copias idénticas fuertemente unidas. Esta cohesión es indispensable para el mecanismo de segregación y se mantiene hasta el momento de la repartición del DNA. Por otro lado, la célula ensambla toda una red de microtúbulos y filamentos en el citoesqueleto que le permiten separar las cromátidas hermanas, repartirlas equitativamente y estrangular el citoplasma dando lugar a las dos células hijas (citocinesis).

2.1. Etapas de la mitosis.

Los cambios morfológicos que sufre la célula a lo largo de la mitosis nos ayudan a dividir este proceso en cinco etapas sucesivas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la profase el material genético se compacta y se condensa formando los cromosomas, cada uno de ellos formado por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero. Los dos centrosomas, fruto de su duplicación durante la interfase, se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula y los microtúbulos de sus ásteres se alargan para formar una estructura denominada huso acromático. La prometafase se inicia con la ruptura de la envuelta nuclear permitiendo que los microtúbulos del huso invadan la zona nuclear e interactúen con los cinetocoros de los cromosomas. La tensión generada cuando esto ocurre, dispone a los cromosomas en el plano central del huso, lo que permite la formación de la placa metafásica (metafase). La transición metafase-anafase constituye uno de los puntos de control del ciclo celular más importantes y solo se inicia cuando todos los cromosomas están perfectamente orientados en la placa metafásica. En anafase las cromátidas hermanas se separan. Primero, los complejos de cohesina se rompen. A continuación, los microtúbulos unidos a los cinetocoros se acortan arrastrando cada una de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos del huso. Por último, los microtúbulos no unidos a los cinetocoros se elongan. Una copia completa del genoma queda distribuida en cada uno de los polos de la célula. Durante la telofase los cromosomas son rodeados por una nueva envuelta nuclear y se descondensan apareciendo los dos nuevos núcleos. En un ciclo celular normal, cada mitosis viene acompañada de una citocinesis o división del citoplasma. En las células animales, una vez dividido el núcleo aparece un surco de segmentación y un conjunto dinámico formado por actina, miosina y muchas otras proteínas estructurales forma un anillo contráctil que estrangula el citoplasma. El resultado final son dos células idénticas a la célula madre original.

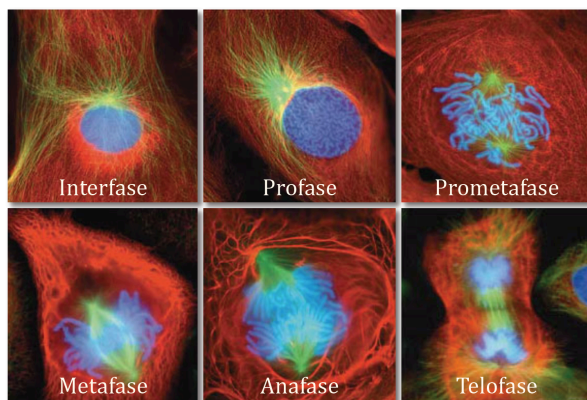


Figura 3. Principales etapas de la mitosis. En estas imágenes de inmunofluorescencias de células de mamífero observamos el DNA en azul, los centrosomas y el huso acromático en verde y la actina en rojo. (de C.L. Rider).

2.2. Mecanismos moleculares de la mitosis.

Desde el punto de vista molecular existen varios mecanismos que regulan la progresión por la mitosis, entre los que destacan la fosforilación proteica y la proteólisis. Mientras la entrada en mitosis es monitorizada por una cadena de fosforilaciones compleja, la transición metafase-anafase y la salida de mitosis son reguladas por la proteólisis proteica.

2.2.1. Entrada en mitosis y progresión hasta metafase.

En los años sesenta, los estudios de embriología en oocitos y huevos de *Xenopus*, llevaron a los embriólogos a pensar en la existencia de una sustancia capaz de inducir la entrada en meiosis o mitosis. En 1971, se identificó esta sustancia y la denominaron factor promotor de la maduración (*Maturation Promoting Factor, MPF*) (Masui and Markert 1971). En 1988 Lohka y colegas purificaron el MPF, determinando que se trataba de un complejo formado por dos subunidades: una con actividad quinasa que finalmente resultó ser Cdc2 o Cdk1 (Gautier et al. 1988; Hartwell et al. 1973) y otra que resultó ser ciclina B (Evans et al. 1983; Gautier et al. 1990).

En mamíferos, la transición G2/M es inducida por la activación del complejo Ciclina B-Cdk1. Gracias a una red de interacciones compleja, la activación de este complejo se incrementa exponencialmente a lo largo de G2 (Lindqvist et al. 2009; Solomon et al. 1990). Por un lado, la transcripción de ciclina B comienza al final de S, cuando el complejo Ciclina A-Cdk2 activa algunos de sus factores de transcripción (FoxM1, NF-Y y B-Myb) (Laoukili et al. 2005) y alcanza sus niveles máximos al final de G2 (Fung and Poon 2005). Además, Cdk1 está sometida a diversas regulaciones post-traduccionales. Por un lado es activada por fosforilación en su residuo T161, por una quinasa activadora de Cdks y por otro se encuentra inhibida por fosforilaciones en sus residuos T14 e Y15. Si bien, las quinasas Wee1 y Myt1 son responsables de fosforilar estos residuos inhibitorios, las fosfatasas Cdc25 se encargan de su desfosforilación. Por tanto, la activación de Cdk1 depende también del balance de estas quinasas/fosfatasas (O'Farrell 2001). Sorprendentemente, el propio complejo ciclina B-Cdk1 inhibe por fosforilación a las quinasas Wee1 y Myt1 mientras que activa a su activador, Cdc25 (Booher et al. 1997; Hoffmann et al. 1993; Laoukili et al. 2005; Lindqvist et al. 2005; Watanabe et al. 2004). Advertimos pues, la existencia de un *feedback* positivo que conlleva a la activación progresiva y exponencial de Ciclina B-Cdk1. Al final de G2 y principio de mitosis, Ciclina B-Cdk1 fosforila muchísimos sustratos (lamininas, condensinas, quinesinas, elementos del aparato de Golgi...) (Blangy et al. 1995; Nigg et al. 1996; Nigg 2001; Peter et al. 1991). Éstos monitorizan los cambios morfológicos que tienen lugar durante las primeras

etapas de la mitosis: separación de centrosomas, condensación del DNA (en la que también está implicada Ciclina A-Cdk2), ruptura de la envuelta nuclear, dinámicas del aparato de Golgi, formación del huso acromático... No obstante, además de Cdk1 otras quinasas mitóticas contribuyen a la entrada y monitorización de estas primeras etapas (Nigg 2001). De entre ellas destacan la familia de las *Polo like kinases*, encabezadas por Plk1 (van de Weerd and Medema 2006), la familia de quinasas Auroras (A, B y C) (Carmena and Earnshaw 2003) y la familia de las NEKs (NEK2, *Never in mitosis gene A-related kinase 2*) (Faragher and Fry 2003; O'Connell et al. 2003). Estas quinasas intervienen en múltiples procesos como la activación del complejo ciclina B-Cdk1 (Seki et al. 2008; Toyoshima-Morimoto et al. 2001), duplicación y maduración de los centrosomas (Barr and Gergely 2007), formación del huso acromático (Brennan et al. 2007; Cowley et al. 2009; Seong et al. 2002), condensación de la cromatina (Goto et al. 2002) orientación de los cromosomas y estabilización de la placa metafásica (Adams et al. 2001)... Por tanto, podemos concluir que el inicio y la progresión de las primeras etapas de la mitosis están marcados por la activación ordenada de una red de quinasas mitóticas. Mediante la fosforilación, la célula consigue rápidamente la activación de diversas enzimas y proteínas estructurales que generan los cambios morfológicos que permiten la llegada hasta metafase.

2.2.2. Transición metafase-anafase y salida de mitosis.

Desde un punto de vista molecular, la transición metafase-anafase se inicia con la activación del APC por medio de la unión con uno de sus activadores; Cdc20. Éste es la diana final sobre la que actúa el SAC. Cada cromosoma de la placa metafásica debe tener unido uno de sus cinetocoros a un microtúbulo de uno de los polos y el otro a un microtúbulo del polo opuesto. El SAC actúa como sensor de este proceso y se mantiene activo mientras existe algún cromosoma no unido correctamente. Como consecuencia, Cdc20 es reclutado por el complejo Bubr1-Mad2-Mad3 imposibilitándose la activación del APC. Una vez todos los cromosomas se encuentran en la placa metafásica correctamente unidos a los microtúbulos, el SAC se desactiva y Cdc20 queda libre para unirse al APC (Musacchio and Salmon 2007). Éste ubiquitina dos proteínas: securina y ciclina B; (Lim et al. 1998) y desencadena dos eventos que inician la salida de mitosis: la separación de las cromátidas y la desactivación de Cdk1. En primer lugar se activa separasa, pues ésta se mantiene inhibida por su unión a securina y por fosforilación por Cdk1. Separasa es la proteasa que rompe las cohesinas centroméricas liberando las cromátidas hermanas (Stemmann et al. 2001). En segundo lugar, la salida de mitosis requiere revertir todos los cambios morfológicos originados en la célula, para lo cual, es fundamental la desactivación de Cdk1 mediante la degradación de ciclina B. Una

vez Cdk1 es desactivada, las fosfatasas desfosforilan y activan a Cdh1, el segundo coactivador del APC. Éste monitoriza la salida de mitosis mediante la degradación de los principales reguladores mitóticos: Plk1, Aurora A, Aurora B, TPX2... (Sullivan and Morgan 2007) (Figura 4).

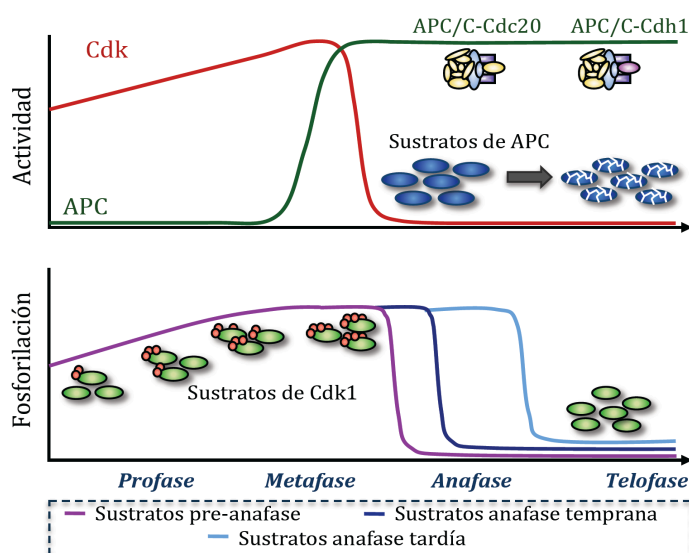


Figura 4. Control de la salida de mitosis. La activación de APC–Cdc20, da lugar a la degradación de securina y de ciclina B. Cdk1 se desactiva favoreciendo la activación de fosfatasas. Como consecuencia, securina es rápidamente desfosforilada. Al inicio de anafase se defosforilan algunos sustratos como INCENP, Fin1, Ase1... para favorecer el desplazamiento de las cromátidas hasta los polos. Por otro lado, otros sustratos son defosforilados al final de anafase; ej. Sic y Cdh1. Cdh1 defosforilado se activa y se une a APC; APC–Cdh1 degrada muchas proteínas mitóticas como Plk1, Aurora A, Aurora B, TPX2.

2.2.3. Importancia de la desfosforilación en la salida de mitosis.

Si bien la activación de Cdk1 monitoriza la entrada y progresión en la mitosis y es responsable de los cambios morfológicos que acontecen en las primeras etapas, es fácil advertir que, si la salida de mitosis requiere la reversión de estos cambios, tanto la desactivación de Cdk1 como la desfosforilación de todos sus sustratos, son eventos imprescindibles en este proceso (Mochida and Hunt 2007; Skoufias et al. 2007; Sullivan and Morgan 2007). Mientras las quinasas han sido reconocidas como los motores que conducen el ciclo celular, hasta hace pocos años, escasa importancia se le ha dado al papel de las fosfatasas (Trinkle-Mulcahy and Lamond 2006). Al principio se aceptó que las fosfatasas mantenían una actividad basal constante a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, existen claras evidencias de que las fosfatasas son activadas al final de la mitosis. En *Saccharomyces cerevisiae* la fosfatasa Cdc14 tiene un papel fundamental en la monitorización de la telofase y de la citocinesis (Stegmeier and Amon 2004). Los mutantes de Cdc14 muestran una parada mitótica en telofase, posterior a la división nuclear pero previa a la citocinesis; similar a la presentada por los mutantes que expresan una ciclina no degradable por APC (Visintin et al. 1998). Como fosfatasa de los sustratos de Cdk, Cdc14 contribuye a la desactivación de esta enzima al activar a su inhibidor, Sic 1 y al factor de transcripción de éste, Swi 5. Además, activa a Cdh1, el cuál al unirse a APC, regula la proteólisis de muchos sustratos al final

de la mitosis y en la transición a G0/G1. Otras funciones importantes atribuidas a la actividad de esta fosfatasa son la elongación del huso en anafase, la segregación del rDNA, la formación del cuerpo medio y la citocinesis (Bardin et al. 2000; D'Amours et al. 2004).

Durante la mayor parte del ciclo celular, Cdc14 se localiza inactivo en el nucleolo secuestrado por su inhibidor Net1. Tan solo en anafase es liberado mediante dos rutas distintas: FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) y MEN (*Mitotic Exit Network*). Al inicio de anafase, separasa inhibe a la fosfatasa PP2A que mantiene a Net1 desfosforilado, lo que permite que Cdc5 (Plk1) lo fosforile y como consecuencia Cdc14 se libere del nucleolo (Figura 5). Esta primera oleada de liberación es parcial y permite a la fosfatasa intervenir en las dinámicas de los microtúbulos y de los cromosomas (pues desfosforila algunos sustratos como Sli15 Ask1, Fin1 y Ase1...) y en la segregación del rDNA (D'Amours and Amon 2004). A su vez, Cdc14 interviene en la activación de la ruta MEN a través de la activación de Cdc15. Esta ruta culmina con la liberación total de Cdc14, quién en una anafase más tardía desfosforila otros sustratos de Cdk1 como Sic1, Swi5 e incluso Cdh1. A pesar de que no ha sido demostrado, es posible que Cdc14 también intervenga en el desensamblaje del huso mitótico, así como en la descondensación de los cromosomas.

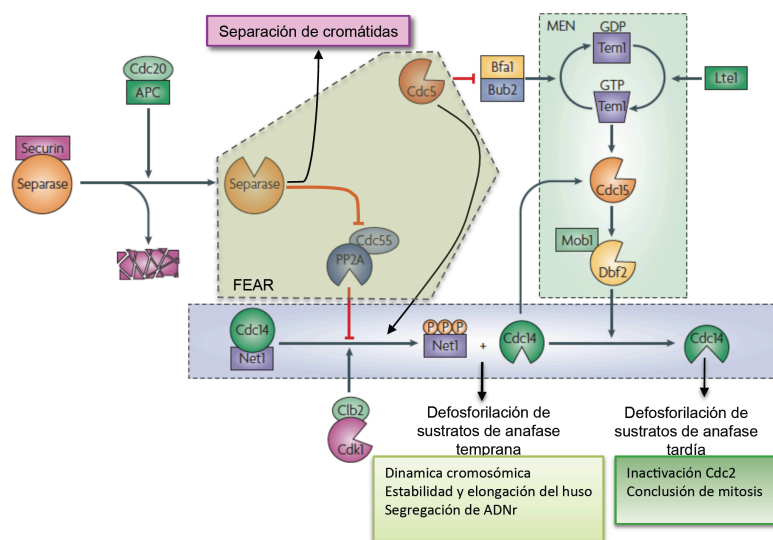


Figura 5. Activación de Cdc14. La activación parcial de Cdc14 al principio de la anafase es consecuencia de la fosforilación de su inhibidor, Net1. Mediante un mecanismo no muy conocido se activa la ruta FEAR, separasa inhibe a la fosfatasa PP2A, permitiendo que Net1 sea fosforilado por Clb1-Cdk1 y por Cdc5. La activación total de Cdc14 se desencadena en la anafase tardía tras la activación de la ruta MEN por la propia Cdc14 y por Cdc5. El resultado final es la activación completa de Cdc14 y la salida de mitosis (Sullivan and Morgan 2007)

En mamíferos, no se sabe mucho sobre los mecanismos que inducen la defosforilación de los sustratos de Cdk1 en la salida de mitosis. Por un lado, la implicación de los ortólogos de Cdc14 en este proceso no es clara (Berdougo et al. 2008; Mocchiari et al. 2010). Por otro lado, en los dos últimos años se han atribuido papeles esenciales en la salida de mitosis a las fosfatasas PP1 y

PP2A (Schmitz et al. 2010; J. Q. Wu et al. 2009). Parece plausible, pues, la implicación de varias fosfatasa en este proceso.







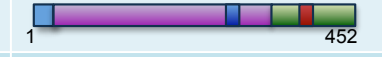
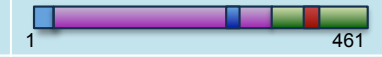
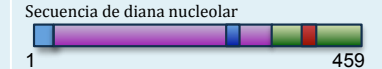
3. La familia de las fosfatasa Cdc14.

La familia de Cdc14 integra un conjunto de fosfatasa pertenecientes a la superfamilia PTP con actividad dual, pues estas fosfatasa son capaces de desfosforilar tanto fosfotirosinas como fosfotreoninas. Todas ellas comparten un dominio N terminal de unos 350 aminoácidos muy conservado (80% de homología), en el que destaca un dominio A que contribuye a la especificidad del sustrato y un dominio B con actividad catalítica. En éste se integra el motivo HCX5R, esencial para la actividad fosfatasa. (Gray and Barford 2003).

Cdc14 fue descubierto en *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell et al., 1973), en el cual tiene un papel esencial en la salida de mitosis, en el silenciamiento y en la segregación del rDNA y en la citocinesis (Stegmeier and Amon 2004). Sin embargo, a pesar de su elevada homología, encontramos entre sus ortólogos diferencias en su localización y en sus funciones (ver tabla 2). En mamíferos existen dos ortólogos: Cdc14a y Cdc14b (Li et al. 2000). Cdc14a se localiza en los centrosomas en interfase y se distribuye por todo el citoplasma en mitosis (Mailand et al. 2002). Su sobreexpresión induce el fraccionamiento del centrosoma y la formación de husos mitóticos aberrantes, mientras que la disminución en su expresión utilizando iRNA se relaciona con problemas en la separación de los centrosomas en profase, en la segregación cromosómica y en la citocinesis. (Mailand et al. 2002). Por su parte, Cdc14b posee una secuencia diana nucleolar, que sitúa a la fosfatasa en el nucleolo durante la interfase. Por el contrario, durante las primeras etapas de la mitosis se difunde por todo el citoplasma y se localiza en la zona media del huso y en el cuerpo medio durante la anafase y la telofase (Cho et al. 2005). Los estudios con iRNA para Cdc14b le han atribuido funciones en la organización nuclear (Nalepa and Harper 2004), la duplicación de los centriolos (J. Wu et al. 2008), la regulación de M/G1 (Rodier et al. 2008) y la activación del punto de control del daño al DNA en G2 (Bassermann et al., 2008). Sin embargo, los modelos genéticos deficientes en Cdc14a o Cdc14b no corroboran los resultados obtenidos por iRNA (Berdougo et al. 2008; Mocciaro et al. 2010). Las líneas celulares inmortales hTERT-RPE deficientes en Cdc14a y las líneas de carcinoma colorrectal humano deficientes en Cdc14b no presentan ningún problema en el transcurso de la mitosis, lo que indica la dispensabilidad de al menos una de estas dos fosfatasa en el ciclo celular. En este estudio, tampoco se encontró

ninguna implicación de Cdc14b en la activación del punto de control del daño al DNA. En contraposición, sí se observaron problemas en la reparación del daño al DNA tras rupturas de doble cadena tanto en las células deficientes en Cdc14a como en las deficientes en Cdc14b.

Tabla 2. Ortólogos de Cdc14

Ortólogos	Estructura	Localización	Funciones	Sustratos
ScCdc14		Nucleolo (I) Nucleoplasma (I) Citoplasma (M) Anillo contráctil (M)	Salida de mitosis Citocinesis Replicación del ADN	Acm1, Sic1, Swi5, Cdh1/Hct1cPds1, Mob1, Bfa1, Cdc15, Fin1, Ase1, Ask1, Sli15, Sld2, Dbp2, Pol12.
Clp1(Sp)		Nucleolo (I) Centrosomas del huso (M) Citoplasma (M) Anillo y Septo (M)	G2/M Citocinesis	Clp1, Cdc25 Ase1, Klp9, Cdc15, Myo2.
CeCdc14		Citoplasma (I) Centrosomas (M) Cuerpo medio (M) Núcleo y nucleolo de células postmitóticas	Citocinesis	Proteínas asociadas al huso mitótico Zen-4.
XCdc14a		Centrosomas (I) Cuerpo medio (M)	Citocinesis G2/M	No descrito
cCdc14a		Centrosomas (I) Citoplasma (M)	Reparación del ADN	No descrito
hCdc14a		Centrosomas (I) Citoplasma (M)	Duplicación de centrosomas Reparación del ADN Citocinesis	P53, INCENP, Cdh1, p27, MKLP1, SIRT2, Erk3, PR-Set7.
XCdc14b		Núcleo (I)	Desconocido	No descrito
cCdc14b		Núcleo, Nucleolo (I) Citoplasma (M)	Reparación del ADN	No descrito
hCdc14b		Núcleo, Nucleolo (I) Citoplasma (M) Zona media (M) Cuerpo medio (M)	Duplicación de los centriolos M/G1 Punto de control del daño al ADN Reparación del ADN	P53, Skp2, SIRT2, Cdh1, Erk3, PR-Set7.

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; X: *Xenopus laevis*; c: chicken; h: human.
NLS: Señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal). NES: Señal de exportación nuclear (Nuclear Export Signal)
(I): Interfase; (M): Mitosis

Por otro lado, en humanos se ha descrito la presencia de una retroduplicación de Cdc14b, abundante en cerebro y testículo, a la que se ha denominado Cdc14c (Rosso et al. 2008). Ésta no está presente en otros mamíferos como en *Mus musculus*.

En conclusión, mientras en levaduras las funciones de Cdc14 han sido perfectamente caracterizadas, en mamíferos los resultados obtenidos con sus ortólogos Cdc14a y Cdc14b y en humanos Cdc14c, hasta ahora no son muy claros.

4. La meiosis

La meiosis, del griego *disminución*, es un tipo de mitosis especializada en la que se generan gametos haploides. Para ello, las células germinales inician dos ciclos de división sucesivos entre los cuales no existe duplicación del DNA. Durante la primera división se segregan los cromosomas homólogos mientras que durante la segunda división, de manera similar a la mitosis, se separan las cromátidas hermanas, dando lugar a cuatro gametos haploides. Este proceso es esencial en la reproducción sexual, en la cual, dos gametos haploides procedentes de organismos de sexo opuesto se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide que originará un nuevo organismo.

4.1. Etapas de la meiosis.

La meiosis comienza con un fase G1 y una fase S similares a las de cualquier ciclo celular. Sin embargo, tras la duplicación del DNA se inicia el primer proceso propio de la meiosis; la recombinación homóloga (RH)*; durante la cual, los cromosomas homólogos se reconocen, aparean y forman las uniones físicas que les permiten mantenerse unidos hasta el momento de segregarse. Convencionalmente se divide en cinco etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Durante el leptoteno los cromosomas comienzan a condensarse en filamentos largos, recorridos por un armazón proteico llamado elemento axial, gracias al cual, los telómeros se anclan a la envuelta nuclear. En zigoteno, los cromosomas homólogos se reconocen y se aparean a lo largo de toda su longitud. Una serie de filamentos transversales mantiene unidos los elementos axiales de cada pareja, formándose una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico (CS). Esta conformación cromosómica en parejas de homólogos se denomina bivalente o tetrad. El

* El proceso de RH transcurre entre la duplicación del DNA y el inicio de la condensación completa de los cromosomas y ruptura de la envuelta nuclear. No existe un consenso sobre si estos eventos se sitúan al final de G2 o al inicio de la profase I. A pesar de que a lo largo de esta etapa se inicia la condensación de los cromosomas, éstos no adquieren una compactación completa. Molecularmente, la actividad de ciclina B-Cdk1 es baja. Por ello, en este trabajo consideré este proceso integrado en la fase G2.

paquitenio comienza cuando todos los cromosomas están perfectamente sinaptados. Se trata de la fase más larga de la meiosis, durante la cual, un intercambio recíproco de fragmentos entre las cromátidas no hermanas de la tetrada da lugar a los quiasmas. Su importancia radica en dos hechos. Por un lado es el mecanismo que permite mantener los cromosomas homólogos unidos hasta el momento de la segregación y por otro lado, el intercambio de DNA entre los cromosomas paterno y materno incrementa la variabilidad genética de los descendientes. Durante el diploteno se desensambla el complejo sinaptonémico, dejando los cromosomas homólogos unidos únicamente por los quiasmas. Llegados este punto el DNA continúa su condensación que finalizará tras la diacinesis. A partir de este momento la meiosis progresa de manera similar a una mitosis, la envuelta nuclear desaparece, los centrosomas se desplazan a los polos celulares y forman el huso mitótico. Los bivalentes se disponen en la placa metafásica perfectamente orientados. Al inicio de la anafase se resuelven los quiasmas y el acortamiento de los microtúbulos permite la separación de los cromosomas homólogos. Finalmente se generan dos células hijas con la mitad de cromosomas que su célula madre. Estas células inician rápidamente una segunda división que progresa de manera similar a una mitosis. En este caso, en la anafase se segregan las cromátidas hermanas de cada cromosoma. El resultado final son cuatro gametos haploides.

4.2. Mecanismos moleculares de la meiosis.

La entrada y progresión por la meiosis requiere tanto de reguladores propios de la mitosis como de reguladores específicos de la meiosis. La decisión de entrada en meiosis tiene lugar en G1 (Geijsen et al. 2004). En organismos multicelulares los mecanismos moleculares que regulan este

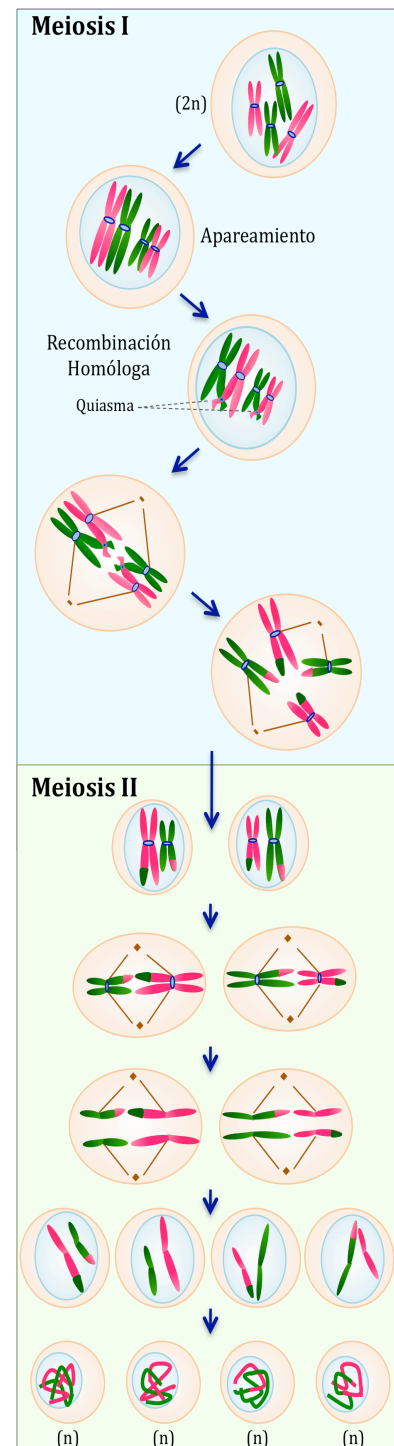


Figura 7. Esquema de la meiosis. Tras una primera división meiótica en la que se segregan cromosomas y una segunda división meiótica en la que se segregan cromátidas se forma cuatro gametos haploides genéticamente distintos.

proceso son variados y poco conocidos. En levaduras se sabe que existen dos reguladores que inducen la entrada en meiosis: IME1 e IME2. Ime1 es un factor de transcripción que favorece la síntesis de toda la maquinaria necesaria para la meiosis. Ime2 es una quinasa homóloga a las Cdk que al unirse a las ciclinas de G1 favorece la entrada a una fase S premeiótica. La duplicación previa a la meiosis transcurre de manera similar a la previa a la mitosis, sin embargo dura más tiempo, probablemente por requerimientos para la interacción de los homólogos (Ofir et al. 2004).

La recombinación homóloga se inicia en el leptoteno cuando, tras la duplicación, la transesterasa Spo 11 genera multitud de rupturas de doble cadena en el DNA (*double strand breaks, DSB*) (Keeney et al. 1997). La ruta del daño al DNA se activa: ATM fosforila H2AX y como consecuencia se amplifica la señal mediante un proceso que integra muchas proteínas como BRCA1 y DMC1/Rad51. A su vez, el material genético se condensa en largos filamentos recorridos por un armazón proteico denominado elemento axial (EA). Éste está constituido por las proteínas SYCP2 y SYCP3 que interaccionan con las cohesinas (algunas mitóticas y otras específicas de la meiosis como STAG3, Rec8, SMC1 β) favoreciendo que la cromatina se organice en forma de bucles. Durante el zigoteno, los cromosomas homólogos se aparean y sus elementos axiales se conectan por fibras transversales constituidas por proteínas como SYCP1, SYCE1, SYCE2... formándose una estructura trifibrilar denominada complejo sinaptonémico (CS) (figura 9). En cuanto a los DSB, la mayor parte de las rupturas son reparadas por recombinación, mediante un proceso de no-entrecruzamiento previo al paquíteno, mientras que un pequeño porcentaje madura para dar lugar a los quiasmas (Allers and Lichten 2001). El paquíteno es la fase más larga de la meiosis pues es en este momento en el que se producen las reparaciones del DNA por entrecruzamiento (Guillon et al. 2005). El proceso de formación de quiasmas requiere de proteínas cromosómicas y de recombinación (Mlh1, Msh5, Rad51, Rad54...) que se localizan en los llamados nódulos de recombinación. Además, otras proteínas como Cdk2, Atm y TRP13 (Barchi et al. 2008; Ortega et al. 2003; Roig et al. 2010) también están implicadas en este proceso mediante mecanismos desconocidos. Una vez se han producido los entrecruzamientos, en el diploteno, el complejo sinaptonémico se desmonta y los cromosomas quedan unidos por los quiasmas. Primero se desensambla el elemento central (SCYP1) y a continuación los elementos laterales (SYCP3).

La progresión hacia la primera división meiótica requiere la reactivación de las Cdk. Hacia el final del paquíteno se comienzan a transcribir las ciclinas A1, B1 y B2 (Wolgemuth et al. 2002). La activación de Ciclina A1-Cdk1/Cdk2 es fundamental en la progresión por diaquinesis y en la entrada en meiosis (Liu et al. 1998), pues juega un papel esencial en la activación del MPF. Otra quinasa

mitótica importante es Aurora B, la cual interviene en el desensamblaje de los elementos laterales del CS y en la fosforilación de histona-H3 (Sun and Handel 2008). La progresión por las primeras etapas de meiosis I está regulada por mecanismos moleculares similares a los de la mitosis que desencadenan la desaparición de la envuelta nuclear, la duplicación de los centrosomas y formación del huso. No obstante, la segregación de los cromosomas homólogos requiere ciertas especificidades. Primero es necesario que la cohesión de las cromátidas hermanas se mantenga durante toda la meiosis I. Para ello, el complejo de cohesinas meiótico difiere del complejo mitótico. La proteína Rec8 sustituye el complejo Scc1. Esta cohesina es eliminada por separasa de los brazos de las cromátidas hermanas en anafase I pero no de sus centrómeros, lo que mantiene a las cromátidas fuertemente unidas hasta anafase II (Kitajima et al. 2003). En segundo lugar, los bivalentes deben orientarse adecuadamente en la placa metafásica de manera que los microtúbulos de un polo se unan a los cinetocoros de uno de los cromosomas de la pareja y los microtúbulos del polo opuesto se unan los cinetocoros del cromosoma homólogo. Al igual que en la mitosis, el SAC controla la transición metafase I-anafase I.

La transición meiosis I – meiosis II constituye un periodo corto de tiempo en el cual no existe fase S. Para ello, la actividad de Cdks no es inhibida por completo, aunque debe ser lo suficientemente baja como para permitir la salida de meiosis I. Esto se consigue mediante dos mecanismos: la inhibición parcial de la degradación de ciclina B y el incremento de su síntesis en la entrada en meiosis II (Iwabuchi et al. 2000). En levaduras y en oocitos, Cdc14 y Cdh1 también son importantes en esta transición pues intervienen en la desfosforilación de sustratos de Cdk1 y en la degradación de las proteínas mitóticas que ya no son necesarias. Durante la meiosis II los cromosomas segregan sus cromátidas hermanas mediante mecanismos moleculares similares a los descritos en la mitosis.

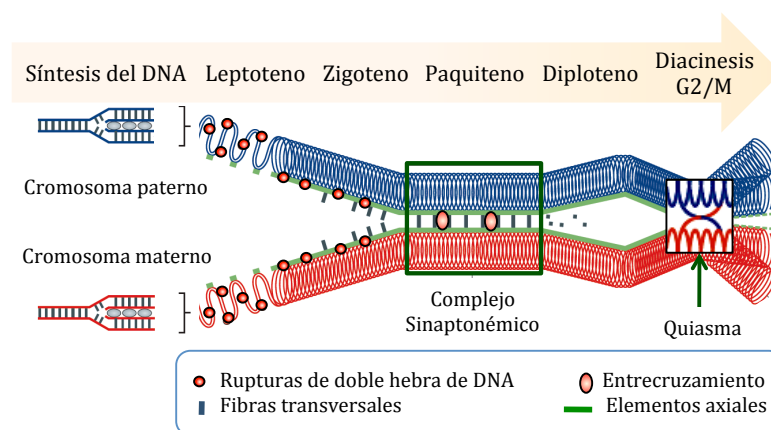


Figura 8. La recombinación homóloga. Durante el paquíteno, el complejo sinaptonémico favorece que algunas de las rupturas de DNA generadas en leptoteno maduren y se reparen por medio de entrecruzamientos denominados quiasmas, elementos indispensables para la segregación de homólogos en meiosis I. (modificado de (Burgoyne et al. 2009))

4.3. Punto de control del paquitenio.

La meiosis, al igual que la mitosis, requiere de puntos de control que regulen la transición ordenada por cada una de sus fases. Dada la complejidad de los procesos que conducen a la RH, es fácil imaginar que este proceso esté perfectamente monitorizado. En mamíferos, un primer punto de control vigila el apareamiento y sinapsis de los cromosomas en zigoteno. Cuando existe algún problema en alguno de estos dos procesos, los meiocitos se paran en esta etapa y mueren por apoptosis. Éste es el caso de los espermatocitos de los modelos de ratón deficientes en Spo11, en las enzimas encargadas de la reparación por mal apareamiento: Msh4 y Msh5, en la recombinasa Dmc1 (Burgoyne et al. 2009; Kneitz et al. 2000; Yoshida et al. 1998) y en la proteína SYCP3 (Yuan et al. 2000). Sin embargo, este punto de control en el zigoteno es lábil y existen muchos casos en los que los meiocitos son capaces de progresar hasta el paquitenio. En paquitenio encontramos el punto de control más fuerte de la meiosis. Este *checkpoint* vigila que el proceso de recombinación se produzca adecuadamente y sólo una vez todos los cromosomas han formado sus quiasmas permite que los meiocitos avancen hacia la primera división meiótica. Cuando existe algún problema en este proceso, el punto de control se activa fuertemente interrumpiendo la progresión en la meiosis y desencadenando rutas de apoptosis mediada por p53 (Odorisio et al. 1998).

El punto de control de paquitenio responde ante diversas señales. La primera señal que puede activar este punto de control es la persistencia de daño al DNA. Aunque la recombinación homóloga se inicia mediante DSB en leptoteno, la reparación de estas rupturas debe iniciarse antes de llegar al paquitenio. Algunos modelos de ratón como los deficientes en Brca1, Brca2 y en Rad51C (Cotroneo et al. 2007; Odorisio et al. 1998; X. Xu et al. 2003) mantienen la señalización de fosfo- γ -H2AX dispersa por todos los cromosomas en paquitenio, lo que activa el *checkpoint*. En segundo lugar, el punto de control de paquitenio controla la sinapsis y la recombinación. Defectos en la formación del complejo sinaptonémico, en el mantenimiento de la estructura bivalente, en el proceso de entrecruzamiento o en su reparación, activan este punto de control desencadenando apoptosis. Ejemplos de ello son los modelos de ratón deficientes en las proteínas sinaptonémicas SYCE1, SYCE2 y SYCP1 (Bolcun-Filas et al. 2007; Bolcun-Filas et al. 2009; F. A. de Vries et al. 2005) o el modelo deficiente en Mlh1 en el cual los cromosomas sinaptan perfectamente pero son incapaces de formar los quiasmas, lo que también activa el *checkpoint*. El tercer proceso al que es sensible el punto de control del paquitenio es el silenciamiento de la cromatina no sinaptada de los cromosomas sexuales. Las diferencias entre los cromosomas X e Y impiden que ambos sinapten a

lo largo de toda su longitud. Tan solo una pequeña región denominada PAR (*pseudoautosomal region*) permite su sinapsis y entrecruzamiento. La cromatina no sinaptada sufre modificaciones que silencian completamente su transcripción (MSCI, *meiotic sex chromosome inactivation*), constituyendo una zona denominada cuerpo sexual. En este silenciamiento es fundamental la fosforilación de la histona γ -H2AX, proceso en el que parecen intervenir BRCA 1 y la quinasa ATR. Así, el modelo de ratón deficiente γ -H2AX, presenta una parada en paquiteno condicionada por la ausencia de MSCI (Celeste et al. 2002). Por último, cabe destacar que en numerosas ocasiones la ausencia de una proteína desencadena problemas a varios niveles del proceso. Este es el caso de los ratones deficientes en Cdk2, los cuales presentan problemas en la reparación de los DSB, sinapsis de los cromosomas y en el MSCI (Ortega et al. 2003; Viera et al. 2009); y de los ratones deficientes en Atm, que presentan problemas en el procesamiento de los DSB, la formación del CS y la recombinación (Y. Xu et al. 1996).

Por tanto, son múltiples los defectos que activan el punto de control del paquiteno desencadenando la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, apenas se conocen cuáles son las moléculas que actúan como sensores de éstas señales y cuáles son las rutas de transducción que originan la parada en el ciclo meiótico. En levaduras, las proteínas Mec1 (*atm*), Rad24 (*Rad1*), Rad17 (*Rad24*) y Mec3 parecen estar implicadas en la detección de las señales de paquiteno. Cuando éstas se activan, Mek1 es activada por fosforilación; la cual, a su vez, fosforila Red1 y se genera la parada en paquiteno (Roeder and Bailis 2000). Aunque los mecanismos moleculares que controlan este proceso no se conocen en detalle, parece ser que la parada en el ciclo se debe a que como consecuencia final la actividad de Cdk1 se mantiene baja, debido a la expresión de su inhibidor Swe1 (*Wee1*), la inhibición de Cdc25 (en levaduras de fisión) y al mantenimiento de niveles bajos de ciclina B. En estos organismos el promotor de las ciclinas B presenta una secuencia denominada MSE (*middle sporulation element*) que es reconocida por determinados factores de transcripción. La expresión de la ciclina B está reprimida por la expresión del factor Sum1 hasta el momento en el que finaliza la recombinación homóloga. En este momento el activador transcripcional Ndt80 se activa por fosforilación y los niveles de Sum1 decrecen (Hochwagen and Amon 2006). Si bien en mamíferos se ha descrito que al final de paquiteno comienza la reexpresión de algunas ciclinas (Wolgemuth et al. 2002), hasta el momento nada se sabe de las moléculas que actúan como sensores de este proceso ni de las rutas de transducción que operan en la parada del ciclo.

5. La espermatogénesis.

En mamíferos, la producción de los gametos masculinos tiene lugar en el testículo mediante un proceso denominado espermatogénesis. En el interior del testículo encontramos una red de túbulos seminíferos rodeados por un tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado y por una cápsula de tejido conjuntivo denso denominada túnica albugínea. Mientras en el epitelio seminífero de estos túbulos es donde se localizan las células germinales que dan lugar a los espermatozoides, en el tejido conjuntivo se encuentran dispersas las células intersticiales de Leydig que sintetizan hormonas como la testosterona. La espermatogénesis o formación de espermatozoides requiere de la generación de células haploides mediante divisiones meióticas y la maduración de éstas para dar lugar a los espermatozoides. El desarrollo de este proceso depende de la interacción de las células germinales con las células somáticas testiculares (Sertoli, peritubulares y Leydig) y las señales hormonales producidas tanto por la hipófisis como por el propio testículo.

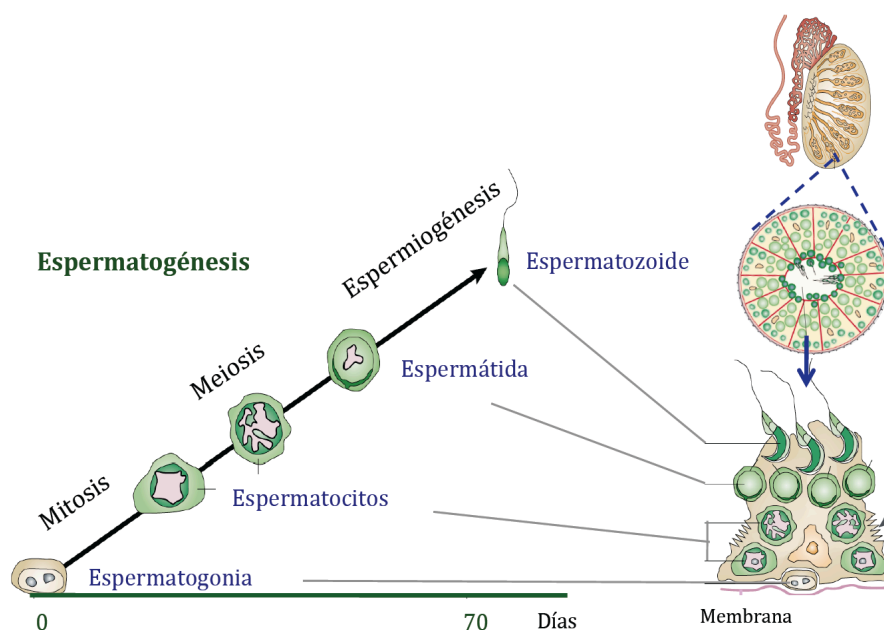


Figura 9. La espermatogénesis. Durante la espermatogénesis las espermatogonias se dividen por mitosis y diferencian en espermátocitos que a su vez entran en meiosis para generar las espermátidas haploides. Éstas maduran hasta transformarse en espermatozoides. En el epitelio seminífero encontramos todas estas células asociadas a las células de Sertoli mediante uniones de oclusión. A medida que las células maduran van migrando de la zona basal a la adluminal. El proceso dura 70 días (35 en ratones). (Modificado de (Cooke and Saunders 2002))

En la zona más basal del epitelio seminífero se localizan las espermatogonias, células germinales diploides que se dividen por mitosis dando lugar a nuevas espermatogonias, algunas de las cuales maduran para dar lugar a los espermátocitos (espermatocitogénesis). Los espermátocitos primarios migran a la zona adluminal donde inician la meiosis. Tras la primera división meiótica cada espermátocito primario da lugar a un espermátocito secundario, el cual rápidamente inicia una segunda división meiótica, para dar lugar a las espermátidas, células haploides que tras la

maduración se transforman en espermatozoides. Es interesante destacar que en el epitelio seminífero, las cariocinesis mitóticas y meióticas, son seguidas de citocinesis modificadas caracterizadas por mantener un puente intracitoplasmático entre las dos células hijas. El resultado final es un sincitio de células comunicadas entre si y sincronizadas.

El proceso de transformación de las espermatídes se denomina espermiogénesis y se subdivide en cuatro fases. Durante la fase de Golgi, se sintetizan las enzimas hidrolíticas en el RER las cuales maduran en el aparato de Golgi y se desprenden en forma de pequeñas vesículas. Éstas se fusionan para dar lugar a la vesícula acrosómica. Al mismo tiempo, los centríolos se separan del núcleo para iniciar la nucleación de microtúbulos que darán lugar al flagelo. En la fase de cubierta la vesícula acrosómica incrementa su tamaño hasta rodear al núcleo. En este momento pasa a denominarse acrosoma. Durante la fase acrosómica, los cromosomas se condensan y el núcleo adquiere una morfología específica. Los microtúbulos se ensamblan favoreciendo el alargamiento de la célula. Al inicio del axonema aparece una estructura anular electrodensa denominada anillo que une la parte principal con la intermedia, alrededor de la cual, las mitocondrias forman una vaina. Al mismo tiempo nueve columnas de fibras densas externas se disponen alrededor del axonema, junto con unas estructuras densas anulares para formar la vaina fibrosa. La eliminación del citoplasma tiene lugar durante la fase de maduración. Este proceso genera una alteración en el sincitio que finalmente permite la liberación del espermatozoide al lumen tubular (espermiación).

Dada la importancia de las interacciones entre las células germinales y las células somáticas del epitelio seminífero, es imposible estudiar *in vitro* todo este proceso. Sin embargo, el uso de modelos de ratón deficientes en determinadas proteínas ha permitido estudiar qué genes son fundamentales en la espermatogénesis y ha permitido relacionar determinadas mutaciones genómicas, anomalías proteicas y otros defectos con los problemas de esterilidad.

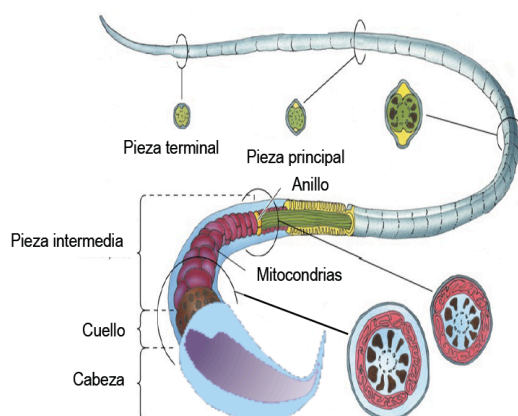
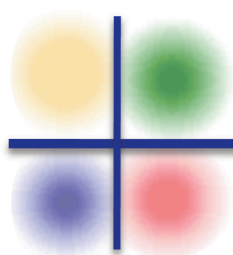


Figura 10. Esquema de un espermatozoide. La cabeza del espermatozoide está constituida por el núcleo, altamente condensado y el acrosoma, el cuál contiene en su interior enzimas implicadas en la fusión con el oocito. El cuello une la cabeza con la cola y en él se localizan los dos centríolos. En la pieza intermedia se dispone la vaina mitocondrial alrededor de las nueve fibras densas que rodean al axonema. La pieza intermedia finaliza en el anillo, una estructura densa que se adhiere al plasmalema impidiendo que las mitocondrias se muevan con la cola. Alrededor del axonema de la cola se disponen siete fibras densas, las cuales desaparecen a la altura de la pieza terminal. (Modificado de Gartner, LP, 2007)

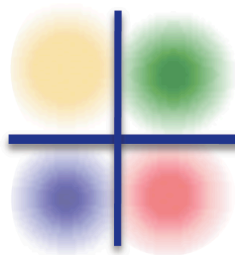


Objetivos

OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo consiste en el análisis de las funciones de la fosfatasa Cdc14b en mamíferos. Para ello hemos desarrollado dos estrategias. En primer lugar, la generación de un modelo de ratón deficiente en Cdc14b con el que analizar las funciones de esta enzima *in vivo*. En segundo lugar, el análisis de los efectos de la sobreexpresión de la fosfatasa en células de mamíferos. En base a ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Análisis del efecto de la eliminación del gen de *Cdc14b* en el desarrollo de mamíferos.
2. Análisis del efecto de la eliminación del gen *Cdc14b* en el desarrollo tumoral.
3. Estudio de las funciones de Cdc14b en la salida de mitosis de mamíferos.
4. Determinación e identificación de nuevas funciones de Cdc14b en la progresión del ciclo celular.
5. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Cdc14b en células de mamíferos.
6. Estudio del papel de Cdc14b en la meiosis de mamíferos.



Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones modificados genéticamente.

Todos los animales modificados genéticamente generados en este estudio se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) atendiendo a la normativa ética y sanitaria provista por la Unión Europea. Todos los experimentos realizados con los ratones fueron aprobados previamente por el comité de bioética y bienestar del Instituto de Salud Carlos III. Los animales fueron observados diariamente y sacrificados cuando presentaron signos obvios de enfermedad. Los ratones modificados genéticamente se mantuvieron en un fondo genético mixto 129/Sv (25%) x CD1 (50%) x C57BL/6J (25%).

1.1. Generación del vector knock-out condicional para *Cdc14b*.

Para generar el vector recombinante de *Cdc14b* se partió del DNA genómico del BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) bMQ-200102 (Sanger Institute). Éste contiene un fragmento genómico de 200 kB del DNA de ratón donde se encuentra el gen de *Cdc14b*. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando *primers* específicos y una polimerasa de alta fidelidad (Expand Fidelity PCR System, Roche), se amplificaron una secuencia diana de 1 kb (que integra los exones 8 y 9) y los brazos de homología 5' y 3' adyacentes a la secuencia diana. Los tres productos de PCR se clonaron en vectores intermediarios pCRII-Zero blunt y pCR4 por el método TOPO (Invitrogen) y fueron secuenciados. A continuación, la secuencia diana se clonó en el vector pDELBOY (facilitado por Rossi) en el sitio *Cla* // *Kpn* I. Los brazos de homología 3' y 5' fueron clonados en los sitios de restricción *Xho* I y *Sal* I respectivamente.

1.2. Generación de las quimeras mutantes para *Cdc14b*.

Cien microgramos del vector de targeting *knock-out* condicional para *Cdc14b* se linearizó con *Not I* y se electroporó en las células embrionarias de ratón (ES) V6.4 de la cepa 129V. Los clones recombinantes se seleccionaron en presencia de neomicina y de ganciclovir. La identificación de los clones recombinantes se determinó por hibridación del DNA (*Southern blot*). Para dicho análisis se utilizaron los sitios de restricción *Kpn I* externos a la construcción y un nuevo sitio *Kpn I* situado entre la secuencia diana y el sitio *loxP* derecho, inexistentes en el alelo salvaje. De un total de 559 clones resistentes a neomicina y ganciclovir tan solo dos de ellos fueron positivos para el análisis por *Southern blot*. El clon 1-224 fue agregado a mórulas de ratón de la cepa CD1. Las tres quimeras macho obtenidas de la agregación se pusieron a cruzar con hembras CD-1. De esos cruces se obtuvieron los primeros ratones heterocigotos para el alelo *loxfrt*. El cruce de estos animales con hembras que expresan la recombinasa *Flp* permitió la escisión del casete de neomicina y la obtención del alelo *lox*. Los animales *Cdc14b^{lox/lox}* fueron cruzados con hembras que expresan la recombinasa *Cre*, lo que permitió la escisión de los exones 8-9 y la obtención del alelo *Knock out* (-).

1.3. Análisis de genotipo de los ratones modificados genéticamente.

La determinación del genotipo de los ratones mutantes para *Cdc14b* fue realizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de polymerase chain reaction). La PCR fue realizada utilizando oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3 y el DNA procedente de la cola del animal.

Las condiciones generales de la PCR fueron las siguientes: un primer paso de 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos que incluyeron las siguientes etapas: 95°C durante 5 minutos; 60°C durante 30 segundos; 72°C durante 30 segundos. Se finalizó con una etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos.

1.4. Tratamientos y procedimientos

A continuación detallamos el conjunto de procedimientos y tratamientos que han sido realizados en este trabajo utilizando animales mutantes para *Cdc14b* ó animales inmunodeprimidos (*SCID*). Todos estos procedimientos fueron aprobados para su realización por el comité de ética y bienestar del Instituto de Salud Carlos III.

1.4.1.Tratamiento con DMBA.

Se administró tópicamente una dosis única de 0,5 mg de 7,12-dimetilbenzantraceno disuelto en acetona en los ratones de una semana de edad. Cinco meses después se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de los papilomas, de los pulmones y de cualquier otro tumor desarrollado para realizar un análisis histológico.

1.4.2.Tratamiento con DMBA-TPA.

Se administró tópicamente una dosis única de 0,5 mg de 7,12-dimetilbenzantraceno disuelto en acetona en los ratones de una semana de edad. Dos semanas después, el crecimiento tumoral se estimuló administrando a los animales tópicamente 5 µg de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) dos veces a la semana durante 12 semanas. Para ello los animales se afeitaron antes de cada administración, con el fin de permitir una mejor distribución del compuesto.

Durante el tratamiento carcinogénico, todos los animales fueron observados diariamente y el tamaño y características de las lesiones en la piel fue anotada. El experimento se vio interrumpido debido al desarrollo de linfomas tímicos muy agresivos. Se analizó la supervivencia de estos ratones y la incidencia de este tipo de tumores.

1.4.3.Cuantificación de xenotransplantes.

Animales inmunodeprimidos de 6 semanas de edad (Charles Rivers) fueron inyectados con las células estables que sobreexpresan H-RasV12, Cdc14b, Cdc14b no activo y células control. Aproximadamente, un total de 5×10^5 células fueron inyectadas en cada lomo de cada ratón. Los animales fueron observados diariamente y el volumen de los tumores fue determinado cada 2 días con la ayuda de un calibre. El volumen del tumor vino dado por la aplicación de la siguiente fórmula: $V=(d^2 \times D)/2$ donde d es el diámetro menor y D es el mayor. Los animales fueron sacrificados por motivos éticos cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1500 mm³.

1.4.4.Análisis histológico e inmunohistoquímico.

Las muestras de tejidos destinadas a su análisis histológico ó inmunohistoquímico se fijaron durante 24 horas en una disolución de formalina (Sigma). A continuación las muestras fueron embebidas en parafina (Panreac). Se realizaron cortes de 5 µm de grosor con ayuda de un micrótopo (Leica). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina de acuerdo a los protocolos convencionales y posteriormente se analizaron al microscopio con la ayuda de la Dra.

Marta Cañamero. En otras secciones fueron realizadas inmunohistoquímicas con los anticuerpos detallados en la Tabla 4.

1.4.5.Obtención de células espermátogenas: esparcidos y aplastados.

Para obtener los esparcidos de las células espermátogenas de ratón se siguieron los protocolos publicados previamente (Fernandez-Capetillo et al. 2003; Llano et al. 2008). En resumen, los testículos se decapsularon y los túbulos seminíferos fueron digeridos primero con colagensa I (sigma) 15 min a 35°C y después con tripsina y DNAasa I durante 15 minutos a 35°C. La tripsina fue inactivada con Soybean Trypsin inhibitor (SBTI, Gibco). Tras filtrar los restos tubulares en coladores de 40uM (Flacon, #2340). La suspensión de espermatoцитos fue centrifugada y resuspendida en una disolución de cloruro sódico al 0,5%. Se dejaron secar 10 µL de la suspensión en los portaobjetos y tras su fijación en paraformaldehído al 2% se procedió con la inmunofluorescencia. Por otro lado, los testículos se detunicaron y los túbulos seminíferos fueron procesados de acuerdo a los protocolos de aplastado descritos previamente (Page et al. 1998).

1.4.6.Cuantificación y obtención de espermatozoides.

Los espermatozoides se obtuvieron mediante la incisión de un corte en el epidídimo. Para cuantificar el número de espermatozoides de cada genotipo, una porción de la zona caudal del epidídimo se sumergió en 500 µL de medio M2 y se incubó a 35°C durante 10 min. A continuación se cuantificaron los espermatozoides en la cámara de Neubauer.

Para la realización de las inmunofluorescencias de los espermatozoides, se puso una gota de PBS sobre un porta objetos. Se cortó la porción caudal del epidídimo y se sumergió en dicha gota de PBS durante unos segundos. Se esperó 15 minutos a que los espermatozoides se adhiriesen a la superficie del porta y a continuación se procedió a la fijación o bien en paraformaldehído al 4% en PBS durante 7 minutos y tritón al 0,15% en PBS durante 2 minutos, o bien en metanol absoluto frío durante 30 minutos.

2. Inducción de xenotransplantes en embriones de pollo.

Los huevos fertilizados fueron incubados en una cámara húmeda a 37°C. A día diez de fertilización, se realizó un pequeño orificio en la cáscara a la altura de la zona de mayor vasculatura

con el fin de conseguir que la cáscara se separase de la membrana corioalantoidea. Diez mil células suspendidas en un volumen de 500 μ L de PBS fueron inoculadas en el interior de la cavidad amniótica. Diez días después (día 20), los huevos fueron abiertos con extrema precaución y tanto las membranas alantoideas como los embriones de pollo fueron fijados en formalina al 10%. Para identificar la presencia de xenotransplantes, se realizaron inmunotinciones con el anticuerpo marcador de proliferación celular Ki67 (Master diagnóstica), el cual reconoce las células de ratón exógenas pero no reconoce las células de pollo.

3. Cultivos celulares.

3.1. Cultivo de MEFs.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, de mouse embryonic fibroblast) fueron obtenidos a partir de embriones de día E13.5-E14.5 de desarrollo. Los embriones fueron aislados del útero y del saco vitelino. Una vez eliminada la cabeza y el hígado, el resto del embrión se cortó lo más finamente posible con ayuda de unas tijeras y unas pinzas y se dispersó en 3 ml de una disolución de tripsina-EDTA (tripsina 0,5 g/L, EDTA 0,2 g/L, NaCl 0,85 g/L). La suspensión de células procedentes de cada embrión se sembró en una placa de cultivo de 150 mm de diámetro. Cuando los fibroblastos alcanzaron el 70% de confluencia (2-3 días después) se recogieron las células y se congelaron alícuotas en N₂ líquido. Al descongelarse estas células se consideraron en pase 2.

Todos los cultivos celulares de MEFs fueron mantenidos en medio DMEM (GIBCO) complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, de fetal bovine serum) y un cóctel antibiótico (estreptomicina y penicilina), en incubadores a 37°C y con un 5% de CO₂.

3.1.1. Curva de crecimiento.

Para la realización de la curva de crecimiento se plaquearon 50.000 células en placas de 35 mm de diámetro y se cuantificó el número de células de cada placa durante siete días consecutivos, mediante el uso de una cámara de Neubauer. El experimento fue realizado por triplicado.

3.1.2. Sincronización en G0.

Para sincronizar las células en G0, los MEFs se dejaron crecer hasta alcanzar un 85-90% de confluencia en las condiciones de cultivo normales descritas previamente. A continuación se cultivaron durante 3 días en bajas concentraciones de suero (0,1% FBS) con el fin de que todas las células se parasen en G0. La entrada en ciclo celular de manera sincronizada se indujo realizando un pase 1:4 y cultivando los MEFS en medio DMEM con un 20% de FBS. Con el fin de mantener las células en mitosis y evitar su progresión hacia un segundo ciclo de división celular, a las 21 horas de la liberación se añadió la droga antimitótica nocodazol (SIGMA) a una concentración de 0,332 μ M (ver tabla 5). Finalmente, se recogieron células a los tiempos indicados para la realización de western blot, inmunofluorescencias y marcaje con EdU.

3.1.3. Citometría de flujo.

La inmunodetección de EdU se realizó de acuerdo al protocolo establecido en el kit: Click-iT EdU Alexa Fluor 488 flow cytometry assay kit (Molecular Probes, Invitrogen). Los datos generados por el citómetro de flujo (FACS Canto) fueron procesados usando el software FACSDiva (Becton Dickinson).

3.1.4. Nucleofección y videomicroscopía.

Se sincronizaron las células en G0 y a continuación 8 μ g de plásmido se nucleofectaron con el kit MEFs1 de AMAXA. A continuación los MEFs fueron plaqueados en cámaras de fondo de cristal (Lab-Tek® II) e incubados a 37°C durante 4 horas. En este momento se añadió nocodazol (0,332 μ M) y se comenzaron los vídeos. El vídeo fue realizado con el microscopio de deconvolución Deltavision tomándose imágenes cada 5 minutos durante 35 horas. El análisis de los datos fue realizado con el software Image J.

3.2. Cultivo de células NIH3T3.

Las células NIH3T3 se cultivaron en un medio DMEM (GIBCO) complementado con 10% de suero bovino (DCS, donator calf serum) y un cóctel antibiótico (estreptomicina y penicilina) en incubadores a 37°C de temperatura y con un 5% de CO₂.

3.2.1. Ensayo de focos.

Se transfectaron las células NIH3T3 por el método de la coprecipitación del DNA con fosfato de Calcio. Se transfectó 1 µg de DNA de las construcciones pD-GFP-14A, pD-GFP-14B y H-Ras V12 y pD-GFP empty en cada muestra. En el caso de la cotransfección de dos de los plásmidos se transfectaron medio microgramo de cada uno y en el caso de la triple transfección 0.3 µg de cada plásmido. Seis horas después de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con PBS-0.1% EDTA y una vez con PBS. A continuación se incubaron en condiciones normales. Al día siguiente, las células fueron pasadas 1:3 y se cambiaron a un medio DMEM suplementado con un 5% de DCS. Tras 21 días en cultivo, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. A continuación se cuantificó el número de focos .

3.2.2. Generación de líneas celulares estables.

Las células NIH3T3 fueron transfectadas con los plásmidos que permiten expresar las fosfatasa fusionadas a GFP por su extremo N'-terminal (pD-GFP-Empty, pD-GFP14A, pD-GFP14B, pD-GFP14B-C314S y H-RasV12) utilizando *Effectene* (Quiagen). Cuarenta y ocho horas después, las células que expresaban dichos plásmidos se seleccionaron con genética (G418, 1 mg/mL). Estas líneas celulares estables se han mantenido en cultivo en las mismas condiciones que las células NIH3T3 pero añadiendo al medio de cultivo G418.

3.2.3. Ensayo de formación de colonias en soft-agar.

Se sembraron 10⁵ células de cada uno de los clones estables en cada pocillo de placas de 35 mm de diámetro (por triplicado) y las células se cultivaron en un medio DMEM al 10%DCS con 0.45% de agarosa (SeaPlaque agarose) en presencia o ausencia de inhibidores (ver tabla 5). El cultivo se mantuvo durante dos semanas, tras las cuales se realizó un recuento del número de las colonias de cada pocillo mediante la realización de una tinción con azul de nitrotetrazolina.

3.2.4. Estudio de motilidad.

Las células fueron plaqueadas en cámaras de fondo de cristal (Lab-Tek® II) al 80% de confluencia. Para analizar su movimiento se tomaron fotografías cada 10 minutos durante 16 horas con un microscopio Leica DM1600 equipado con una cámara digital JVC. Las imágenes fueron procesadas con el software LAS AF 2.0. (Leica application) y tanto las trayectorias individuales de

cada célula como las propiedades de su motilidad fueron calculadas utilizando el software Metamorph 2.0. (Molecular devices).

3.2.5. Ensayo de heridas.

Se dejaron crecer los clones de células que expresan las proteínas de manera estable hasta alcanzar un 100% de confluencia en cámaras de fondo de cristal (Lab-Tek® II). A continuación, con ayuda de una punta de pipeta de 10 µL se realizó una herida que recorrió longitudinalmente la zona media del pocillo. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Para analizar el cierre de las heridas se adquirieron imágenes de cada herida cada 10 minutos durante 16 horas con un microscopio Leica DM1600 equipado con una cámara digital JVC. La cuantificación del espacio invadido se realizó con el software LAS AF. Además se realizaron inmunofluorescencias realizando el mismo experimento en las cámaras Lab-Tek® II desmontables. Las células se fijaron a las 6, 12, 18 y 24 horas de la formación de las heridas y se inmunodetectó la tubulina con el fin de identificar la orientación de los centrosomas. Se consideró que los centrosomas estaban orientados cuando se encontraban en la línea perpendicular a la línea de la herida o dentro de los 50° de desviación con respecto de dicha posición.

4. Procedimientos bioquímicos.

A continuación se expone detalladamente el conjunto de procedimientos bioquímicos que han sido realizados durante este estudio y que han sido incluidos en esta memoria de tesis doctoral.

4.1. Western Blot.

Para la extracción de proteínas de las células cultivadas, en primer lugar las células se lavaron con PBS frío y a continuación se lisaron en una disolución compuesta por NaCl 37mM, NP-40 0,5%, SDS 0,1%, TX-100 1%, Tris-HCl pH 7.4 20mM, EDTA 2 mM, glicerol 10%, PMSF 1 mM y una mezcla comercial de inhibidores de fosfatasa y proteasas (Sigma). La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 30 minutos y las reacciones se pararon añadiendo el tampón de carga (Tris HCl pH 6.8 100 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10% y DTT 200 mM). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE (BioRad). Después de la electroforesis, mediante transferencia húmeda, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa

(BioRad), utilizando el aparato Trans-Blot de BioRad. Estas membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en PBS-Tween y sometidas a inmunodetección usando los anticuerpos que se detallan en la tabla 4. Los anticuerpos primarios diluidos en la disolución de bloqueo, fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS-Tween de diez minutos, los anticuerpos secundarios diluidos en la disolución de bloqueo fueron incubados durante 45 minutos. La detección de los anticuerpos se realizó utilizando el kit de Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer).

4.2. Inmunofluorescencia

Los fibroblastos embrionarios de ratón y las células NIH3T3 cultivados sobre cubreobjetos redondos fueron fijados en una disolución de paraformaldehído al 4% en PBD durante 7 minutos a 37°C y permeabilizados con tritón X-100 al 0,15% en PBS durante 2 minutos a 37°C. A continuación se bloquearon con una disolución de BSA al 1% en PBS durante 1 hora. La inmunofluorescencia se realizó utilizando los anticuerpos específicos que se detallan en la Tabla 4. Para lo cual, los anticuerpos primarios diluidos en PBS con un 0,03% de tritón, se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras tres lavados con PBS se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 en una dilución 1:500. A continuación los anticuerpos secundarios se lavaron con PBS y finalmente los cubreobjetos se montaron en ProLong con DAPI (Molecular Probes). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP5-AOBS-UV).

Los portaobjetos con las células espermátogenas procedentes de los esparcidos y aplastados fueron equilibrados en PBS durante 5 minutos. A continuación se bloquearon durante 2 horas a 37°C en una disolución de bloqueo compuesta por un 10% suero, 3% de BSA libre de IgG (Jackson Scientific), 0,05% de Tritón-X 100 y PBS. Los anticuerpos primarios diluidos en la disolución de bloqueo (ver tabla 4) fueron incubados durante 2h a 37°C. Tras un lavado de 5 minutos con PBS-T, un lavado de 5 minutos con PBS con un 0,03% Tritón y un lavado de 5 minutos con PBS, los anticuerpos secundarios conjugados a los fluorocromos Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 diluidos 1:500, se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación los anticuerpos secundarios fueron lavados con PBS y se dejaron secar los portaobjetos. El montaje se realizó en ProLong con DAPI (Molecular Probes). Las imágenes fueron procesadas con un microscopio Olympus BX61 equipado con un sistema de fluorescencia y una cámara digital Olympus DP70 controlada por análisis software (Soft Imaging System). Las distintas secciones se procesaron usando el software Image J y VirtualDub.

Tras su fijación, las inmunofluorescencias de espermatozoides se realizaron siguiendo un protocolo similar al de las células espermatógenas. En el caso del Mitotracker®Red, los espermatozoides obtenidos del epidídimo fueron incubados 45 minutos en medio M2 con MitotrackerRed 300 nM a 35°C y a continuación fueron fijados en paraformaldehído 4% durante 7 minutos a 35°C.

5. Microscopía electrónica.

Los testículos y epidídimos fueron troceados y fijados en primer lugar en una disolución tamponante de fosfatos (pH=7,4) 0,1M con glutaraldehído al 1,25% y paraformaldehído al 2,5% durante una hora y en segundo lugar, en una disolución de tetraóxido de osmio al 2%. A continuación, se embebieron en una resina plástica Lowicryl K4M (Polysciences, Warrington, PA), siguiendo un protocolo estándar. Las secciones fueron fijadas en acetato de uranilo en metanol y en una disolución tamponante de citrato y posteriormente fueron procesadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM-100CX con un voltaje de aceleración de 60 kV.

6. Generación de plásmidos.

Los DNA complementarios (cDNA) completos de Cdc14A y Cdc14B fueron amplificados por PCR a partir de los plásmidos cedidos por Jiri Lukas (Mailand et al. 2002) y se clonaron en el vector de entrada pENTR-D-TOPO por el método TOPO (Invitrogen). Los mutantes fosfatasa inactiva de Cdc14B (C314A, C314S) se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida de los vectores pENTRY-D-TOPO por el método QuikChange (Site-directed mutagenesis kit, Stratagene) utilizando los oligos ATTGCAGTACATGCCAAAGCTGGCCTT (Fw) y AAGGCCAGCTTTGGCATGTACTGAAT (Rv). Mediante la reacción de recombinación LR por el sistema *Gateway*® (Invitrogen), los cDNA de las formas salvajes de Cdc14A y Cdc14B y los mutantes fosfatasa inactiva de Cdc14B se transfirieron a vectores de destino pDESTINY-3.1 que permiten expresar las proteínas fusionadas a GFP (*Green Fluorescent Protein*) por el extremo N'-terminal (pD-GFP-14A, pD-GFP-14B, pD-GFP-14BC314A, pD-GFP-14BC31A).

Por otro lado se diseñaron shRNA de silenciamiento para el gen de *Cdc14b* y se clonaron en los plásmidos pA90 (pSUPERretro system) y pPRIME-CMV-GFP (generado por Stephen Elledge) para su expresión. Los oligos de silenciamiento del gen *Cdc14b* utilizados para generar estos plásmidos fueron:

- caccggaatccaaaaGACGCGTATAGAACATTAActcttgaaTTAATGTTCTATACGCGTCgggaa
cgagtgggtctcat
- caccggaatccaaaaGGCGACTATTTCCGTCAAAtctcttgaaTTTGACGGAAATAGTCGCCggga
acgagtgggtctcat
- caccggaatccaaaaGCTGCAGTTTCTATATTACtctcttgaaGTAATATAGAACTGCAGCgggaa
cgagtgggtccaa

7. Generación de plásmidos.

A continuación se presentan los reactivos utilizados en la realización de este trabajo. La primera tabla integra los oligonucleótidos utilizados en las PCR del genotipado de los ratones. La segunda tabla los anticuerpos primarios utilizados en western blot, inmunofluorescencias e inmunohistoquímicas y por último se presenta una tabla con los inhibidores químicos.

Tabla 3. Análisis de genotipo			
Alelo	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño (pb)
<i>Cdc14b</i> (+)	224Fw	GGTGGCTAGCACCTGAAGAG	366
	Ex8Rv	GAAGGCAAGAAATCGCTCTG	
<i>Cdc14b</i> (loxfrt)	224Fw	GGTGGCTAGCACCTGAAGAG	491
	224Rv	GGGGAACCTTCCTGACTAGGG	
<i>Cdc14b</i> (lox)	224Fw	GGTGGCTAGCACCTGAAGAG	479
	Ex8Rv	GAAGGCAAGAAATCGCTCTG	
<i>Cdc14b</i> (-)	224Fw	GGTGGCTAGCACCTGAAGAG	466
	14b3armRv	AAAAGCACTTGCTGCCAAAT	
<i>Cdk2</i> (+)	F6L	CAAGTTGACGGGAGAAGTTGTG	450
	IN1R5	TAAGTATGGTGCTGGAGCAGTGAG	
<i>Cdk2</i> (-)	F6L	CAAGTTGACGGGAGAAGTTGTG	360
	IN3R4	GCGATAAGCTTCGAGGGACCTA	
<i>Ciclina A1</i> (+)	A1E1	CGGTGCGCTTGCTAATC	680
	A1E2R	GGTCCTCCTGTACTGCTCAT	
<i>Ciclina A1</i> (-)	HPRT-1	CCTTTGGGCGGATTGTTGTTT	442
	A1E2R	GGTCCTCCTGTACTGCTCAT	

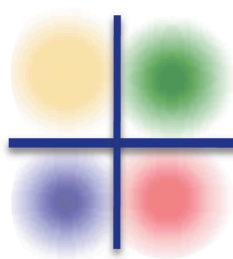
Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados

Antígeno	Tipo	Aplicación	Dilución	Origen
Centrómeros	Humano	IF	1:200	Antbodies incorporated
α -actina	Ratón	WB	1:2000	Sigma
α -tubulina	Ratón	IF, WB	1:2000	Sigma
EdU	Ratón	FACS	1:500	Sigma (Click-it)
Cdc14b	Conejo	IF	1:500	Lifespam biotech.
Caspasa-3-activa	Conejo	IHQ	1:200	RYD systems
SYCP3	Ratón	IF	1:1000	Abcam
Cdk1	Ratón	WB	1:500	Santa Cruz biotech.
pT15 Cdk1	Conejo	WB	1:200	Santa Cruz biotech.
Ciclina B1	Ratón	WB	1:1000	Chemicon International
p21	Conejo	WB	1:250	Santa Cruz biotech.
Ciclina A2	Conejo	WB	1:250	Santa Cruz biotech.
Fosfo-histona H3	Conejo	IF, IHQ	1:250	Millipore
Fosfo-histona H3	Ratón	IF	1:1000	Millipore
Fosfo-Cdk-sustratos	Conejo	WB	1:750	Upstate Biotechnology
Ki67	Rata	IHQ	1:100	GE Healthcare
H3K9tri-m	Conejo	IF	1:100	Abcam
SYCP1	Conejo	IF	1:200	Prestado por Christa Heyting
γ -H2AX	Ratón	IF	1:1000	Upstate Biotechnology
γ -tubulina	Ratón	IF	1:1000	Sigma
Tubulina acetilada	Ratón	WB	1:500	Sigma
Aurora B	Conejo	WB	1:300	Abcam
Ciclina E	Conejo	WB	1:500	Abcam
Ciclina D2	Conejo	WB	1:100	Santa Cruz biotech.
pRb S780	Conejo	WB	1:200	Cell Signaling Technology
pRb S807/810	Conejo	WB	1:200	Cell Signaling Technology
GADPH	Ratón	WB	1:5000	Sigma
Vinculina	Ratón	IF	1:500	Sigma
N-Cadherina	RAtón	IF	1:500	BD transduction laboratories

IHQ: inmunohistoquímica; WB: western blot; IF: inmunofluorescencia; FACS: Citometría de flujo

Tabla 5. Inhibidores utilizados

Nombre	Diana	Concentración	Origen
Nocodazol	Microtúbulos	0,3318 μ M	Sigma
FTI-276	Ras	10 μ M	Sigma
Rac inhibitor	Rac	4 μ M	Calbiochem
ROCK inhibitor II	ROCK	4 μ M	Calbiochem
PD98059	Mek/Erk	50 μ M	Calbiochem
LY294002	PI3K	30 μ M	Calbiochem
Wortmannin	PI3K	2 μ M	Calbiochem



Resultados

RESULTADOS

1. Generación de un modelo de ratón deficiente en *Cdc14b*.

Dado el escaso conocimiento sobre las funciones de la fosfatasa *Cdc14* en organismos superiores, se generó un modelo de ratón condicionalmente deficiente en uno de sus homólogos en mamíferos: *Cdc14b*. Este modelo de ratón modificado genéticamente elimina la funcionalidad del locus de *Cdc14b* y con ello la expresión de dicha proteína, permitiendo profundizar en el conocimiento de las funciones *in vivo* de dicha fosfatasa.

En primer lugar, se elaboró un *vector de recombinación* en el que se incorporó la secuencia del gen que se quería eliminar (exón 8 - intrón – exón 9) flanqueada por dos secuencias *loxP*, un cassette PGK-neo (resistente a Neomicina) flanqueado por dos secuencias *frt* y dos brazos de homología a ambos lados de la secuencia diana (Figura 11). A continuación dicho vector se electroporó en células madre embrionarias de ratón (ES: Embryonic Stem Cells). Tras la recombinación homóloga entre los brazos del vector y el gen, se produjeron los clones recombinantes que portaban el gen de *Cdc14b* modificado genéticamente en uno de sus alelos. De un total de 559 clones analizados, solo dos clones fueron positivos para el análisis por *Southern blot*. Uno de estos clones fue agregado a mórulas de ratón de la cepa CD1 y posteriormente éstas fueron implantadas en hembras pseudopreñadas para la obtención de quimeras. Del cruce de las quimeras macho con hembras de genotipo silvestre (*wt*; *wild-type*) se obtuvieron los primeros ratones heterocigotos (*Cdc14b*^{+/loxfrt}) y del cruce de heterocigotos con heterocigotos, se obtuvieron los primeros ratones homocigotos para el alelo *loxfrt* (ratones *Cdc14b*^{loxfrt/loxfrt}).

La estrategia utilizada en este modelo de ratón está basada en los sistemas de escisión mediados por las recombinasas específicas *Cre-loxP* y *Flp-frt*. Así, a través del cruce con los ratones transgénicos que expresan la recombinasa *Flp*, la enzima es capaz de reconocer los sitios *frt* y escindir el cassette de neomicina del alelo *loxfrt*. El alelo generado tras la eliminación del casete de resistencia a neomicina se denominó alelo *lox*, el cual se diferencia del alelo salvaje en las dos pequeñas secuencias *loxP* circundantes a los exones 8 y 9. Por último, la secuencia diana exón 8 – exón 9 se suprimió al cruzar los ratones *Cdc14b*^{lox/lox} con ratones transgénicos que

expresan la recombinasa *Cre*, la cual reconoce los sitios *loxP*, dando lugar al alelo KO (ratones *Cdc14b*^{-/-}).

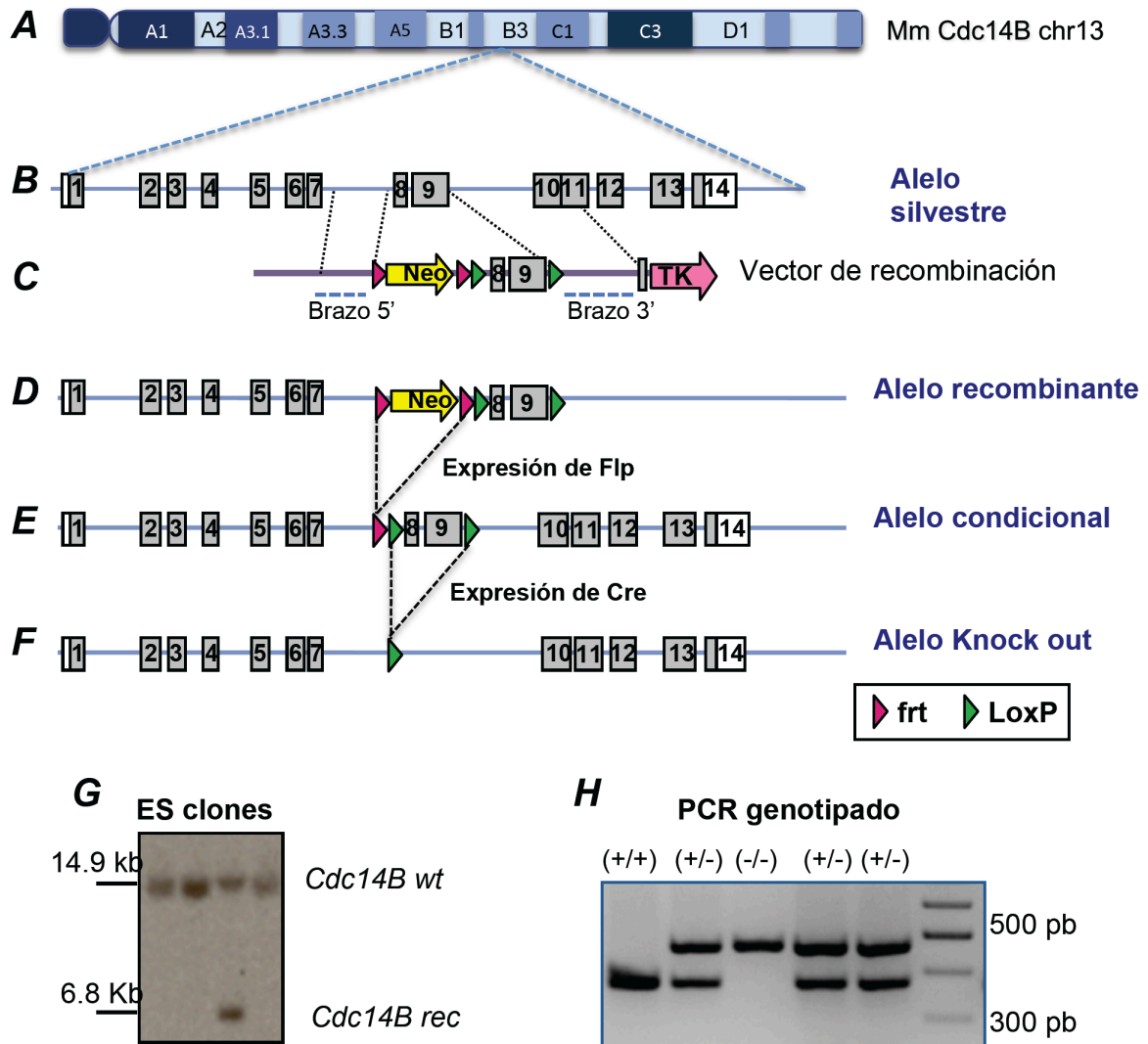


Figura 11. Estrategia para la eliminación condicional del gen *Cdc14b*. Representación esquemática de los alelos generados. Después de la recombinação homóloga entre el locus de *Cdc14b* de ratón (A) y el vector de targeting (B) los clones de células ES recombinantes son seleccionados en presencia de neomicina y ganciclovir. El marcador de selección *PGK-neo* en el alelo recombinante (C) queda flanqueado por dos sitios *Frt* que son eliminados tras la expresión de *Flp*, lo que da lugar al alelo condicional (D). Después de expresar *Cre*, los exones 8 y 9 flanqueados por sitios *loxP* son eliminados generándose el alelo *knock out* (F). (G) Screening de los clones. Resultados de Southern Blot tras el marcaje con la sonda izquierda. En el clon 1-224 se observa una banda de 7 kb que corresponde con la banda esperada para el alelo recombinante. (H) PCR para el genotipado de los alelos *wild type* (+/+), heterocigoto (+/-), y *knock out* (-/-).

Cabe destacar que los ratones *Cdc14b^{loxfrt/loxfrt}* se comportan como ratones *Knock out Cdc14b^{-/-}*, debido a que el cassette de neomicina en el intrón 7 interfiere en la transcripción de los transcritos de *Cdc14b*. Por ello utilizaré la terminología ratones *Cdc14b^{-/-}* indistintamente.

Por último, es importante resaltar que la eliminación de los exones 8-9 conlleva a la eliminación del 46% de los aminoácidos de la proteína y también a la eliminación de la actividad fosfatasa. Por otro lado, la proteína resultante de un posible splicing del exón 7 al exón 10 cambiaría el marco de lectura de los tripletes del mRNA dando lugar a una proteína que nada tendría que ver con *Cdc14b*.

2. *Cdc14b* es dispensable en el desarrollo murino.

Con el fin de caracterizar el efecto de la ausencia de expresión de *Cdc14b* *in vivo*, se realizó un experimento de envejecimiento en el que se compararon tres grupos de ratones: ratones de genotipo silvestre (*Cdc14b^{+/+}*), ratones *Knock out* u homocigotos para el alelo deficiente de *Cdc14b* (*Cdc14b^{-/-}*) y ratones heterocigotos o parcialmente deficientes en *Cdc14b* (*Cdc14b^{+/-}*). Tanto los ratones parcialmente deficientes en *Cdc14b* como los ratones *Knock out* presentan un desarrollo normal durante toda su vida. Tal y como queda reflejado en la figura 12, el 65% de los ratones *Cdc14b^{-/-}* alcanzan las 100 semanas de edad (punto final del experimento).

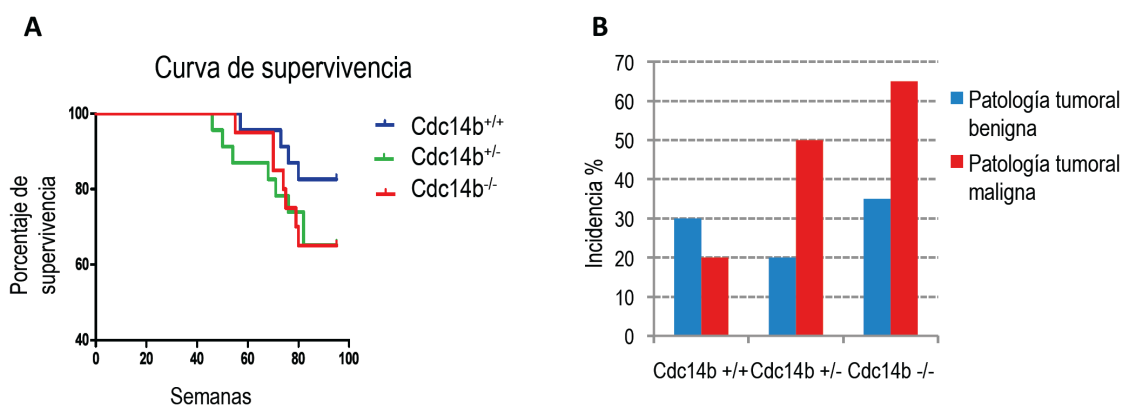


Figura 12. Supervivencia de los ratones deficientes en *Cdc14b*. (A) Curva de supervivencia. Se estudió la supervivencia de 15 machos y 15 hembras de cada genotipo. (B) Incidencia de la patología tumoral espontánea.

Dado que los ratones deficientes en *Cdc14b* no mostraron ningún problema en el desarrollo, no se identificó ninguna patología que pudiera estar asociada a la falta de esta fosfatasa. Sin embargo, sí se detectaron problemas de esterilidad en los ratones machos. Las

necropsias revelaron que estos ratones presentan atrofia testicular, lo que sugirió que esta fosfatasa podría estar implicada en la espermatogénesis. Debido a ello, este fenotipo se estudio en profundidad (ver punto 5).

Tabla 6. Incidencia de las principales patologías observadas en los ratones *Cdc14b*^{-/-} *

	<i>Cdc14b</i> (+/+)	<i>Cdc14b</i> (-/-)	<i>Cdc14b</i> (+/-)
Patología no tumoral			
Infección	5 1 (20)	10 2(20)	10 1(10)
Hiperplasia glandular de estómago	5 1(20)	5 1(20)	
Hiperplasia de corazón ventrículo izquierdo		5 1(20)	
Esteatosis hepática/focos hepatitis	15 3(20)	5 1(20)	10 1(10)
Hiperplasia islotes de langerhans	5 1 (20)	20 4(20)	
Piedras en vejiga		5 1(20)	
Hiperplasia células leydig	10 1 (10)	30 3(10)	10 1(10)
Hiperplasia prostática benigna	20 2(10)	10 1(10)	20 2(10)
Espermatocele	10 1 (10)		
Hiperplasia endometrial	40 4(10)	20 2(10)	10 1(10)
Quiste folicular	10 1(10)	20 2(10)	10 1(10)
Atrofia testicular	30 3(10)	100 10(10)	50 5(10)
Patología tumoral benigna			
Adenoma Hepático	15 3(20)	5 1(20)	5 1(20)
Adenoma Pulmonar	10 2(20)	10 2(20)	10 2(20)
Cistoadenoma seroso	10 1(10)	30 3(10)	10 1(10)
Papiloma		5 1(20)	5 1(20)
Adenoma de hipófisis		10 2(20)	5 1(20)
Patología tumoral maligna			
Linfoma	15 3(20)	30 6(20)	25 5(20)
Adenoma pulmonar grado IV		10 2(20)	5 1(20)
Fibrosarcoma		10 2(20)	5 1(20)
Carcinoma hepatocelular	5 1(20)	20 4(20)	10 2(20)
Adenocarcinoma de intestino delgado			5 1(20)
Tumor de hipófisis		5 1(20)	5 1(20)
Carcinoma epidermoide			5 1(20)
Tumor de mama		5 1(20)	

* Incidencia dada en porcentaje junto con el número de ratones observado versus el total analizados

2.1. La ausencia de Cdc14b incrementa la susceptibilidad a desarrollar tumores espontáneos de larga latencia.

A pesar de que durante el periodo analizado, los ratones deficientes o parcialmente deficientes en Cdc14b no presentan una mortalidad más elevada que los ratones de genotipo silvestre, con el fin de identificar posibles patologías generadas por la falta de Cdc14b, se realizó un estudio histopatológico de todos los ratones que fallecieron, los que fueron sacrificados al mostrar una enfermedad avanzada y del resto de ratones que cumplieron las 100 semanas de edad. En este estudio histopatológico no se encontraron diferencias entre las patologías presentadas por el grupo de los machos y por el de las hembras en ninguno de los genotipos (a excepción de las alteraciones propias de los órganos sexuales). Por ello, el análisis de los datos se ha realizado sin hacer diferencias entre los dos sexos. Las causas de muerte de estos animales fueron variadas: infecciones, carcinomas hepatocelulares, fibrosarcomas y en su gran mayoría linfomas.

Tampoco se encontraron diferencias entre las patologías no tumorales desarrolladas por los diversos genotipos (ver tabla 6). Así, todos los grupos de ratones desarrollaron anomalías relacionadas con el envejecimiento como por ejemplo hiperplasia prostática benigna, hiperplasia endometrial, hiperplasia gástrica, quistes foliculares, hepatitis, esteatosis... etc. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en la incidencia de la patología tumoral. Tanto los ratones deficientes en Cdc14b como los heterocigotos desarrollan una mayor incidencia de linfomas, fibrosarcomas, carcinomas hepatocelulares, tumores de hipófisis, adenomas de hipófisis, papilomas, carcinomas epidermoides y tumores de mama (Figura 12 y tabla 6).

2.2. Los ratones deficientes en Cdc14b presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores inducidos por tratamientos carcinogénicos.

Dado que los ratones deficientes en Cdc14b presentaron una mayor tendencia a desarrollar tumores espontáneos de latencias largas, se realizaron varios tratamientos carcinogénicos en piel para estudiar si la ausencia de esta fosfatasa favorece el desarrollo tumoral.

En el primer experimento, se sometieron varias camadas de cruces de heterocigotos al carcinógeno DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antreno), el cual predispone al desarrollo de papilomas, de adenomas de pulmón y otras patologías tumorales como los linfomas tímicos (Serrano et al. 1996). Se administró tópicamente una dosis de DMBA la primera semana de vida de los animales. Cinco meses después del tratamiento se sacrificaron los ratones y se cuantificó la presencia de

papilomas, adenomas de pulmón y otras patologías tumorales. Dado el escaso número de papilomas que se desarrollaron en este tiempo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratones analizados. Sin embargo, sí se observó que los ratones deficientes en *Cdc14b* tienen una mayor tendencia a desarrollar adenomas de pulmón bajo este tratamiento. La incidencia de adenomas de pulmón de los de los ratones *Cdc14b*^{-/-} fue del 92% (12 ratones de 13), en contraposición, los ratones control desarrollaron una incidencia del 58% (5 ratones de 12). Además, bajo este tratamiento, los ratones deficientes en *Cdc14b* mostraron una mayor predisposición a desarrollar otros tumores como adenomas hepáticos, linfomas tímicos y carcinomas epidermoides (Figura 13) que no aparecen en los ratones control.

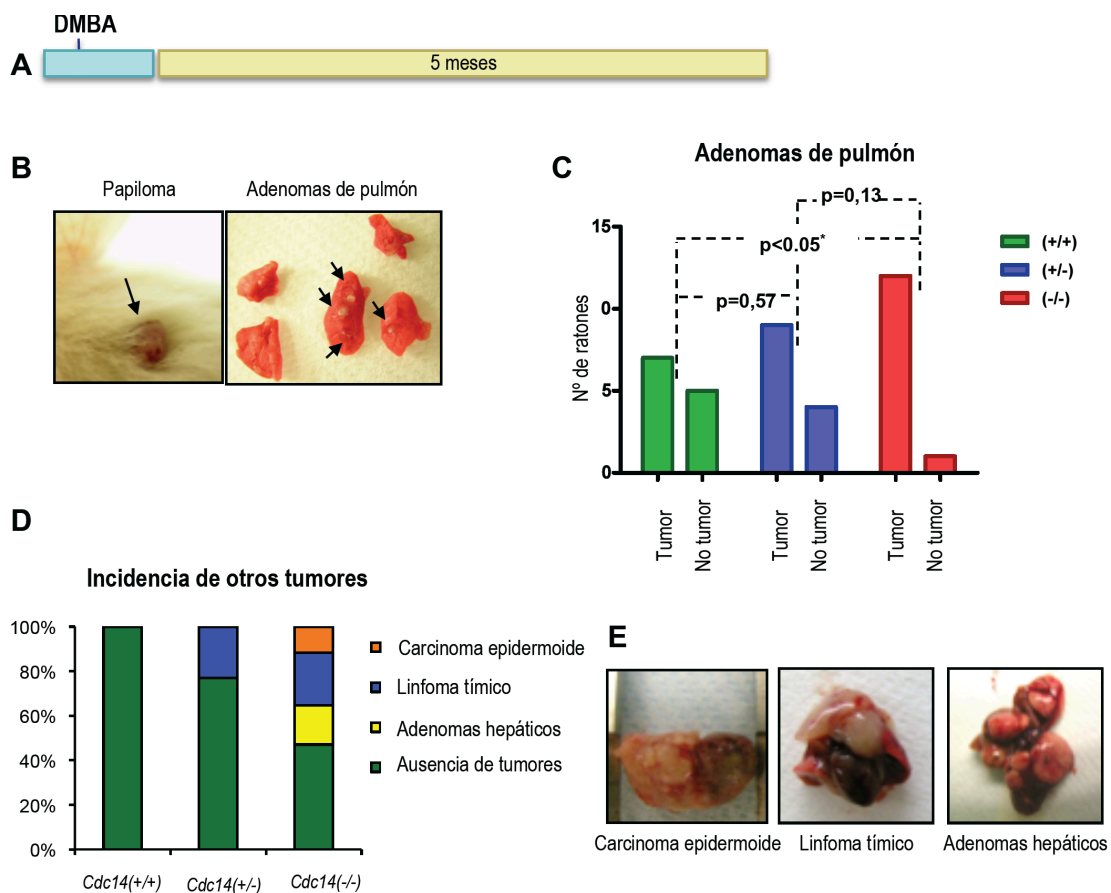


Figura 13. Incremento en la susceptibilidad a desarrollar tumores tras el tratamiento con DMBA. (A) Esquema del protocolo. Se aplicó tópicamente el carcinógeno DMBA en los ratones de una semana de edad. Cinco meses después los animales fueron sacrificados para la cuantificación del número de papilomas, número de adenomas de pulmón y de otros tumores desarrollados. (B) Imágenes representativas del desarrollo de papilomas y adenomas de pulmón. (C) Cuantificación del número de ratones que desarrollaron adenomas de pulmón. (D) Incidencia de otros tumores. (E) Imágenes de otros tumores desarrollados en los ratones *Cdc14b*(-/-)

Dado el escaso número de papilomas inducidos en el experimento anterior, se realizó un segundo experimento en el se aplicó en primer lugar el carcinógeno DMBA y posteriormente el promotor de proliferación TPA. Este tratamiento induce el desarrollo de papilomas en la piel de una forma rápida (Balmain and Pragnell 1983). Estos papilomas se caracterizan por ser hiperplásicos, bien diferenciados y normalmente, benignos. Se administró tópicamente una dosis del carcinógeno DMBA en la primera semana de vida de los ratones y tres semanas después comenzó el tratamiento con el TPA (dos veces a la semana durante trece semanas). Sin embargo, no se pudo hacer un seguimiento del crecimiento de los papilomas debido a que sorprendentemente un 93,3% de los ratones deficientes en *Cdc14b* (14 de 15) fallecieron a lo largo del experimento debido al desarrollo de linfomas tímicos muy agresivos y el 7,7% restante debido al desarrollo de carcinomas epidermoides (1 de 15) (Figura 14).

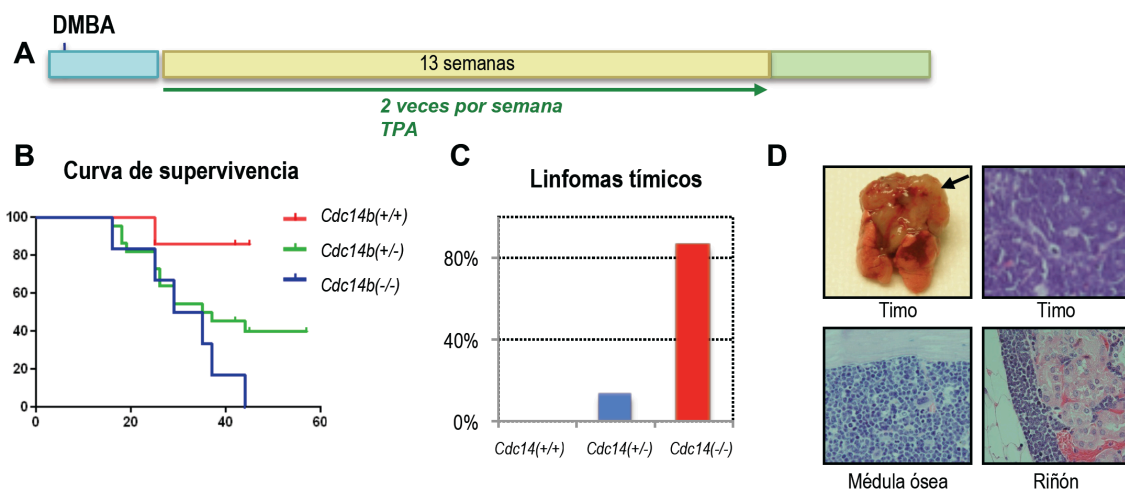


Figura 14. Incremento en la susceptibilidad al desarrollo de tumores tras el tratamiento con DMBA-TPA. (A) Esquema del protocolo. Durante la primera semana de edad, se administró tópicamente una dosis del carcinógeno DMBA en el costado de los ratones. Posteriormente, tras el destete se administró tópicamente TPA dos veces a la semana durante 13 semanas. (B) Curva de supervivencia de los ratones en tratamiento. (C) Incidencia de linfomas tímicos de corta latencia. (D) Fotografía e histología de un linfoma tímico e histologías de otros órganos invadidos por el tumor; médula ósea y riñón.

3. Implicación de *Cdc14b* en la progresión del ciclo celular.

La fosfatasa *Cdc14* tiene una papel fundamental en el control de la salida de mitosis y/o en la dinámica del huso mitótico y en la citocinesis en organismos inferiores como en las levaduras

Sacharomyces cerevisiae (Visintin et al. 1998) y *S. pombe* (Cueille et al. 2001; Trautmann et al. 2001), en *Caenorhabditis elegans* (Gruneberg et al. 2002), en *Xenopus Laevis* (Krasinska et al. 2007)... Análogamente, los estudios en células de mamíferos sobreexpresando o disminuyendo los niveles de Cdc14a o Cdc14b han mostrado anomalías en la mitosis (Mailand et al. 2002; J. Wu et al. 2008). En contraposición, la eliminación genética de las fosfatasas Cdc14a o Cdc14b en líneas celulares DT40 de pollo y en líneas celulares inmortales humanas (hTERT-RPE para Cdc14a y HCT116 para Cdc14b) (Berdougo et al. 2008; Mocciaro et al. 2010), mostraron que la eliminación genética de una de estas fosfatasas en vertebrados parece no tener ninguna repercusión en la división celular.

3.1. Cdc14b es dispensable en la mitosis de mamíferos.

El hecho de que la ausencia de la fosfatasa Cdc14b no genere letalidad embrionaria y que los ratones se desarrollen adecuadamente, es motivo suficiente para suponer que no existen grandes problemas ni en el progreso ni en la salida de mitosis. Sin embargo, no podemos descartar completamente que la mitosis no se encuentre ligeramente comprometida. Para estudiar posibles defectos en la progresión de la mitosis de las células de ratón deficientes en Cdc14b, se tomó como modelo los fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblast, MEFs*) extraídos a día E14,5 y cultivados en medio completo. Tanto las curvas de crecimiento de estas células como el análisis del índice mitótico, demostraron resultados similares para los cultivos de MEFs de genotipo silvestre y los MEFs deficientes en Cdc14b. Mediante el análisis microscópico de las inmunofluorescencias contra α -tubulina y γ -tubulina se determinó la proporción de células en prometafase, metafase, anafase y telofase de los cultivos asincrónicos de ambos genotipos y no se observaron diferencias significativas entre ellos. Tampoco se observó ningún defecto estructural en las células mitóticas deficientes en Cdc14b (Figura 15).

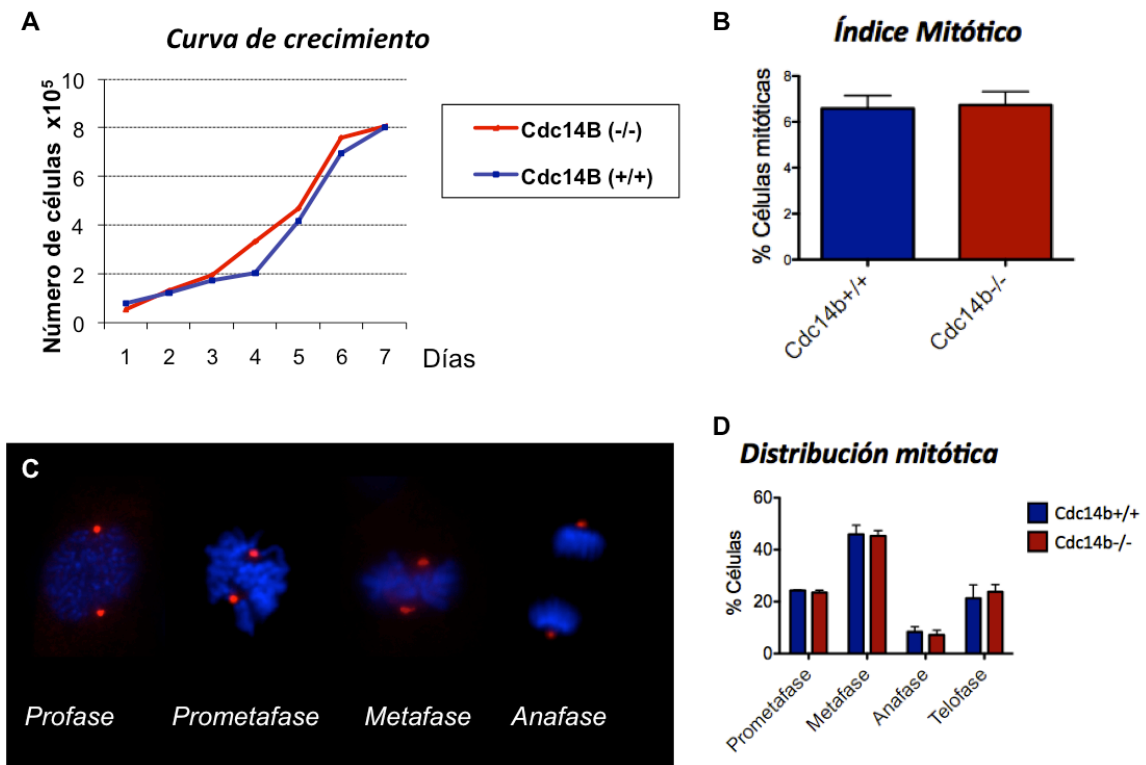


Figura 15. Los MEFs *Cdc14b*^{-/-} no presentan ninguna anomalía mitótica. (A) Curva de crecimiento. Se plaquearon 50.000 células en cada placa de 35 mm de diámetro y se cuantificó el número de células por pocillo durante 7 días consecutivos. (B) Índice mitótico cuantificado mediante inmunofluorescencias ($n_{Cdc14b+/+}=1321$, $n_{Cdc14b-/-}=1278$). (C) Inmunofluorescencias de MEFs *Cdc14b*^{-/-} (Rojo: α -tubulina, azul: DAPI). (D) Distribución mitótica cuantificada por inmunofluorescencia.

Por último, con el fin de determinar si existe alguna anomalía en la salida de mitosis, se cuantificó la duración de la mitosis de las células de ambos genotipos mediante videomicroscopía. Para ello se generaron MEFs que expresan la Histona-2B fusionada a la proteína fluorescente GFP (H2B-GFP). Mediante videomicroscopía se grabaron las células tomando imágenes cada 5 minutos. Se consideró entrada en mitosis al momento en el que el DNA comienza a condensarse, la célula comienza a desprenderse de la placa y adquiere una morfología redondeada. Se consideró salida al momento en el que las dos células hijas se vuelven a adherir a la placa, adquieren su morfología más plana y el DNA descondensa formando el núcleo. El análisis de los videos reveló que no existen diferencias en la duración de la mitosis entre los MEFs de genotipo silvestre y los deficientes en *Cdc14b* (Figura 16). Así pues, con todos estos datos podemos concluir que en ausencia de *Cdc14b* los fibroblastos embrionarios de ratón se dividen correctamente.

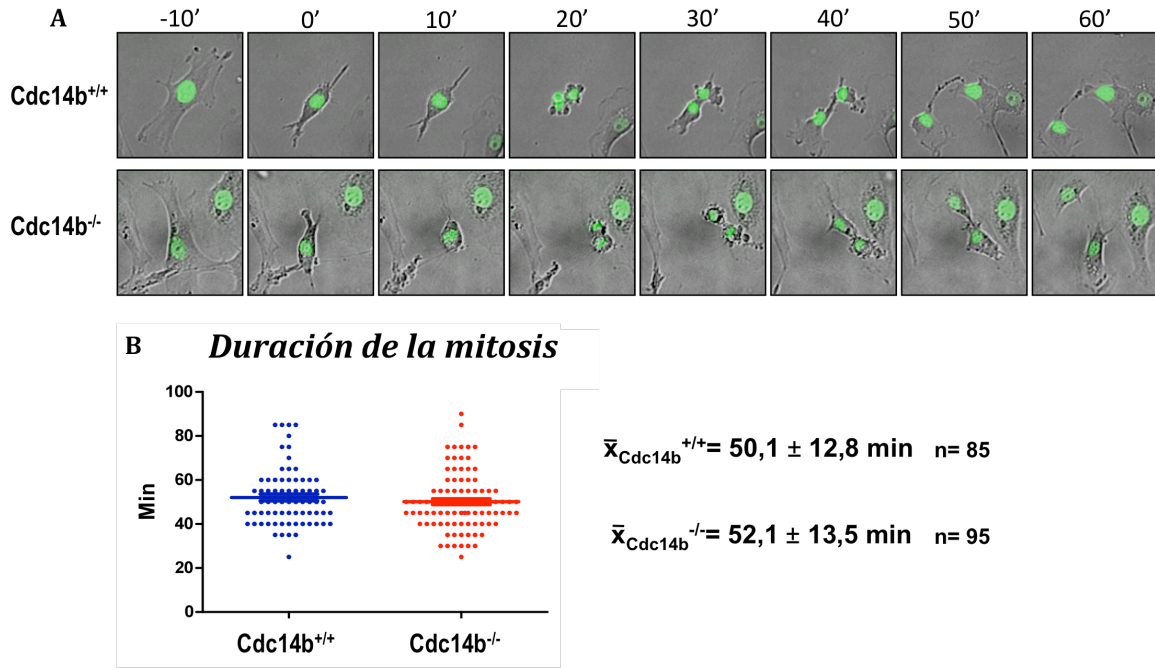


Figura 16. Dispensabilidad de Cdc14b en la mitosis. No se observan diferencias entre la duración de la mitosis de MEFs *Cdc14b*(+/+) y MEFs *Cdc14b*(-/-). (A) Imágenes de los lapsos de tiempos de los video de los MEFs entrando en mitosis. (B) Cuantificación del tiempo de mitosis mediante microscopía.

A continuación se analizó el comportamiento de las células deficientes en Cdc14b ante la droga mitótica; nocodazol. Si bien, a tiempos cortos, los MEFs primarios se paran en mitosis en presencia de nocodazol, a tiempos prolongados, un elevado porcentaje de ellos son capaces de evadir esta parada y salir de mitosis descondensando el DNA (*mitotic slippage*) (Elhajouji et al. 1998). Por ello, mediante videomicroscopía de los MEFs que expresan la histona H2B-GFP, se analizó si la ausencia de Cdc14b favorece esta salida de mitosis y se comprobó que en presencia de nocodazol los MEFs deficientes en Cdc14b se comportan igual que los MEFs control (Figura 17).

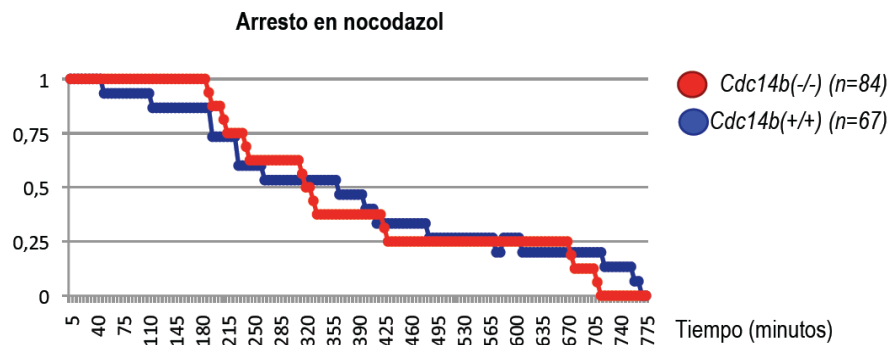


Figura 17. Respuesta normal al arresto en nocodazol de los MEFs deficientes en Cdc14b. Curva de tiempo de mitosis. Se cuantificó por videomicroscopía el tiempo que cada célula se mantiene parada en mitosis en presencia de nocodazol. Se consideró tiempo cero el momento en el que la célula se redondea y tiempo final el momento en el que sale de mitosis y recupera su morfología plana.

3.2. La ausencia de Cdc14b induce una entrada en mitosis prematura.

En las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, Clp1p (ortólogo de Cdc14) además de regular la citocinesis interviene en la transición G2/M (Trautmann, 2001). Las células deficientes en Clp1p presentan una entrada en mitosis precoz en comparación con las células de genotipo silvestre, mientras que las células que sobreexpresan la fosfatasa sufren un retraso en la entrada en esta fase. Por otro lado, en *Xenopus laevis*, XCdc14A también tiene cierta importancia en la transición G2/M y de manera similar, la sobreexpresión de esta fosfatasa retrasa la entrada en mitosis de huevos de *Xenopus* estimulados (Krasinka, 2009). Dado que en mamíferos Cdc14b es dispensable en la progresión y en la salida de mitosis, nos preguntamos si podría tener algún papel en la transición G2/M. Para ello se sincronizaron MEFs en G0 mediante confluencia y privación de suero. A continuación las células se cultivaron en medio con un 20% de suero para inducir la entrada en el ciclo celular. Las células fueron recogidas a distintas horas. A partir de las 21 horas se añadió al medio nocodazol para mantener las células en mitosis.

El tiempo de entrada en mitosis se abordó de diversas formas. En un primer experimento se tomó como marcador de mitosis la fosforilación de la histona-H3 y de los sustratos de Cdk1. Mediante western blot se determinó que las células *Cdc14b*^{+/+} no empiezan a entrar en mitosis hasta las 25 horas después de la liberación de G0; mientras que las células *Cdc14b*^{-/-} comienzan a entrar en mitosis 20-23 horas después de la liberación de G0, alcanzando el máximo a las 30 horas (Figura 18 D). En segundo lugar, se realizó una marcaje para la fosfo-histona H3 y por inmunofluorescencia se cuantificó el número de células mitóticas de cada una de las muestras de las células analizadas, obteniéndose un resultado similar (Figura 18 C).

Por último, se realizó videomicroscopía de los MEFs nucleofectados con un plásmido que expresa la histona H2B fusionada a GFP. En estos videos se siguieron las células una a una y se determinó el tiempo de entrada en mitosis de cada célula. Se consideró entrada en mitosis al momento en el que la célula redondea su citoplasma y el DNA se condensa (Figura 18 E,F). A pesar de que los MEFs primarios no salen de G0 de manera muy sincronizada y existe un amplio rango de variabilidad en el momento en el que cada célula entra en mitosis, sí pudimos constatar que en su conjunto las células deficientes en Cdc14b entran en mitosis antes de lo que lo hacen las células de genotipo silvestre.

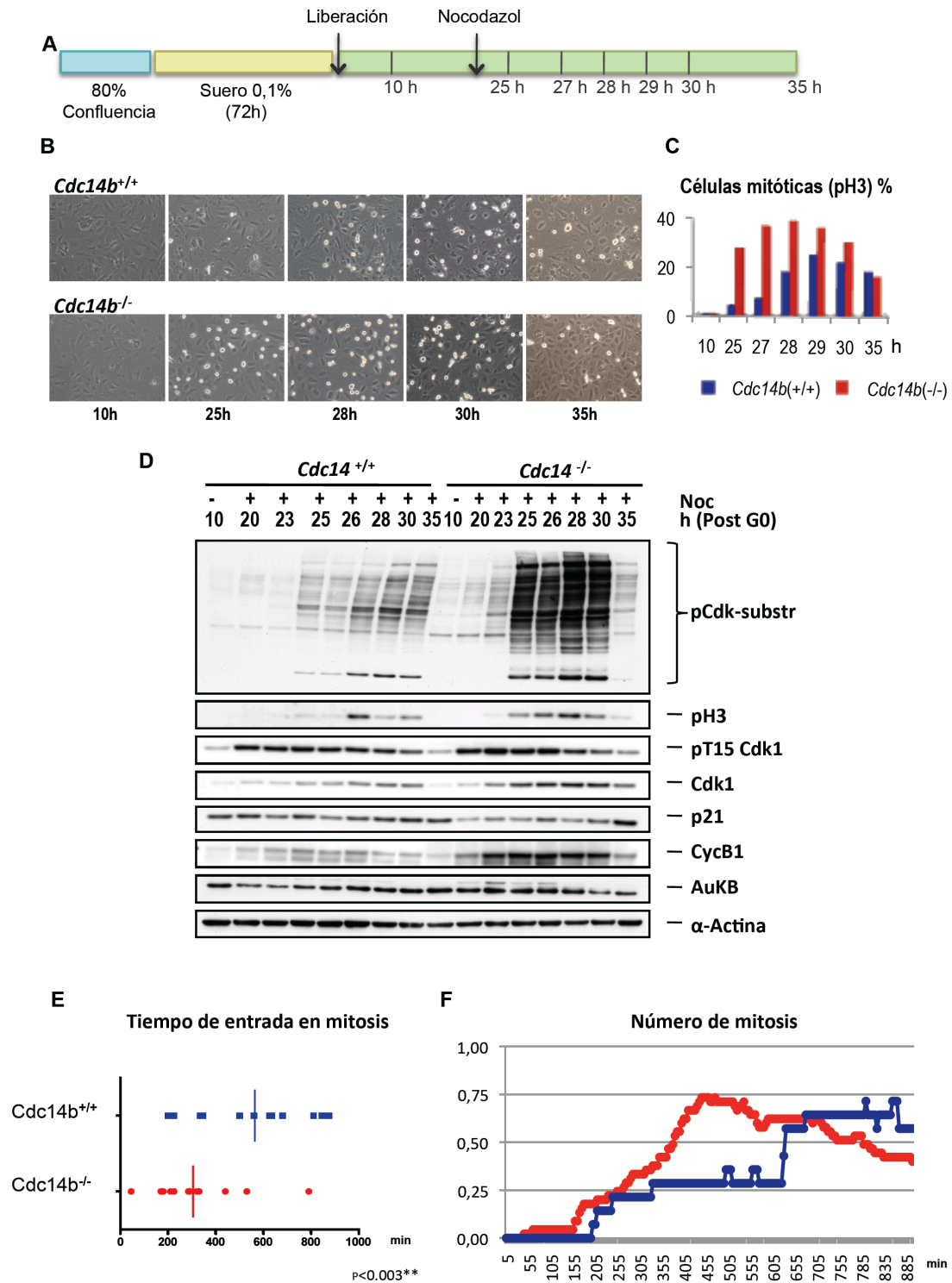


Figura 18. Los MEFs deficientes en *Cdc14b* entran en mitosis prematuramente. (A) Esquema del protocolo de sincronización. (B) Imágenes de campo claro de la progresión del cultivo desde G0 hasta 35 horas después. Nótese que a las 35 horas el número de mitosis disminuye debido a la evasión de la parada en mitosis provocada por el nocodazol. (C) Cuantificación del número de mitosis (prometafases y metafases) mediante inmunofluorescencias. (D) Estudio de la evolución de los niveles de proteínas a medida que las células van entrando en mitosis. Tanto el patrón de incremento de fosfo-sustratos de Cdk, la fosfohistona-H3 y la ciclina B indican una entrada prematura en mitosis por parte de los MEFs *Cdc14b*(-/-). (E) Cuantificación del tiempo medio de entrada en mitosis por videomicroscopía. (F) Cuantificación por videomicroscopía del tiempo de entrada en mitosis de cada célula (en tanto por uno en función del tiempo)

Además de los fosfo-sustratos de Cdk1 y de fosfo-histona-H3, se comprobó por Western blot los niveles de diversas proteínas mitóticas (Figura 18D). Tanto la evolución de los niveles de fosfohistona-H3 como los de ciclina B corroboran una entrada en mitosis prematura en los MEFs *Cdc14b*^{-/-}. Sorprendentemente se constató dichos MEFs presentan unos niveles más elevados de Cdk1 y ciclina B que los observados en los MEFs control. En este sentido es interesante comentar que en las inmunohistoquímicas de los testículos también se constataron unos mayores niveles de Cdk1 en las muestras *Cdc14b*^{-/-} que en las muestras *Cdc14b*^{+/+} (Datos no mostrados). Cabe destacar que todos estos experimentos fueron realizados por triplicado con tres clones distintos de MEFs primarios.

3.3. Las células deficientes en *Cdc14b* entran en fase S prematuramente .

El hecho de que las células deficientes en *Cdc14b* entren en mitosis antes que las células de genotipo silvestre podría deberse simplemente a un acortamiento de la fase G2 o a un desajuste previo en la transición del ciclo celular. Para comprobar si una vez liberadas en G0, las células de ambos genotipos entran en el ciclo celular y progresan por fase G1 y S de manera similar, se realizó un experimento de marcaje con EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*), un análogo de la timidina que es incorporado en el DNA durante la fase de síntesis. En este experimento se pudo constatar que las células *Cdc14b*^{+/+} comienzan a incorporar EdU a las 17 h tras inducir su entrada en el ciclo celular. Sin embargo, en el caso de las células *Cdc14b*^{-/-}, un 24% de ellas ya han incorporado el nucleótido 15h después de la liberación de G0. Esto indica que dichas células entran en fase S prematuramente. Para estudiar el motivo por el cual se produce dicha aceleración en la progresión del ciclo celular, analizamos por western blot los niveles de diversas proteínas a distintos tiempos tras la inducción de entrada en ciclo celular. Se comprobó que tanto la evolución de los niveles de ciclina D2 como los de pRb son similares en ambos genotipos (Figura 19 C). Sin embargo, es notable que los niveles basales de fosfo-retinoblastoma de los MEFs *Cdc14b*^{-/-} son superiores a los de los MEFs *Cdc14b*^{+/+}. Por último, es interesante destacar que los niveles de otras ciclinas como ciclina A y ciclina E son considerablemente más altos en los MEFs deficientes en *Cdc14b* que en los MEFs control.

Esta sobreexpresión de diversas proteínas (Cdk1, ciclina A, ciclina E, pRb) en las células deficientes en *Cdc14b* podría ser la causa de una aceleración en el ciclo celular. Actualmente estamos analizando en detalle el motivo por el que se producen estas desregulaciones y su relación con la fosfatasa *Cdc14b* (ver discusión).

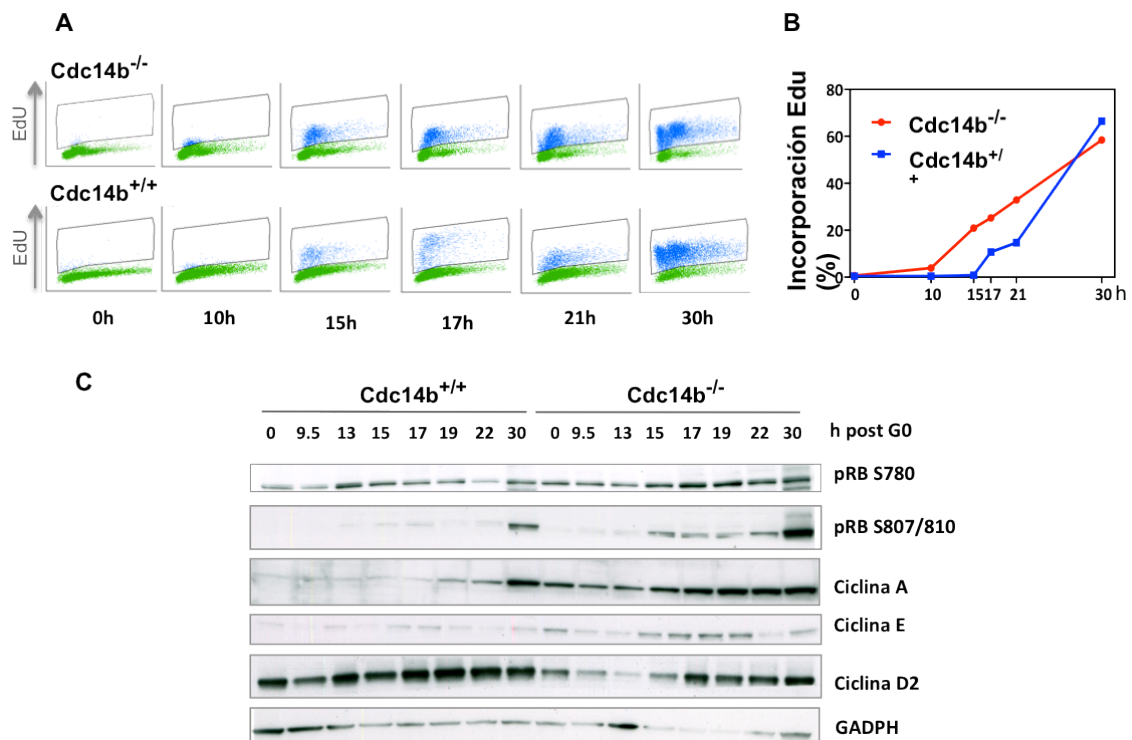


Figura 19. Transición G1/S prematura de los MEFs deficientes en Cdc14b. Se siguió el mismo protocolo de sincronización del experimento anterior y con el fin de analizar la entrada en fase S, en el momento de la liberación se añadió EdU 10 uM. (A) Perfiles de FACs de la incorporación de EdU. (B) Cuantificación de los resultados (C) Estudio de la variación de los niveles de las distintas proteínas a lo largo del tiempo. Nótese las diferencias de los niveles en la expresión de ciclina A, ciclina E y pRb.

4. La sobreexpresión de Cdc14b induce transformación oncogénica.

Con el fin de continuar analizando las funciones de la fosfatasa Cdc14b en mamíferos se realizaron una serie de experimentos sobreexpresando esta fosfatasa en células NIH3T3. Estas células son MEFs immortalizados mediante un protocolo de 3T3. Se ha comprobado que muchas de las enzimas que intervienen en la regulación de la mitosis tienen actividad oncogénica, por ejemplo Aurora A, B... Para analizar el papel de Cdc14a y Cdc14b en tumorigénesis se llevó a cabo un ensayo de focos. La sobreexpresión del oncogén Ras en células NIH3T3 induce la transformación celular y como consecuencia las células pierden la inhibición por contacto y comienzan a crecer en tres dimensiones formando nódulos o focos de células (Jacobsen et al. 2002). Basándonos en este hecho, se utilizó la coexpresión del oncogén HRasV12 y de las fosfatasas Cdc14a y Cdc14b para comprobar si éstas interfieren en dicha transformación, o bien cooperando con el oncogén (incrementando el número de focos), o bien suprimiendo sus efectos (disminuyéndolos). Las

células fueron transfectadas con plásmidos que inducen la expresión de las proteínas HRasV12 y/o Cdc14a y/o Cdc14b. Tras mantener las células en cultivo 21 días, se contabilizó el número de focos en cada placa. Se observó que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las células que expresan el oncogén Ras o las que coexpresan el oncogén Ras y alguna de las dos fosfatasa o la forma inactiva de Cdc14b. Sorprendentemente se observó que la sobreexpresión de Cdc14b por si sola induce la aparición de focos y por tanto transformación celular. Este resultado sugiere una posible implicación de Cdc14b en la transformación oncogénica (Figura 20 B).

Para comprobar si esta transformación celular les confiere a las células la habilidad de crecer en un medio semisólido, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias en soft-agar. De manera similar a lo observado en el ensayo de focos, se constató que la sobreexpresión de Cdc14b induce la transformación celular confiriendo a las células la capacidad de crecer en un medio semisólido. Dado que la sobreexpresión del mutante inactivo no induce dicha transformación, podemos concluir que la actividad catalítica de Cdc14b es esencial en la transformación oncogénica (Figura 20 B).

A continuación, para caracterizar los mecanismos por los que Cdc14b induce esta transformación oncogénica se transfectaron estas mismas células NIH3T3 con determinados plásmidos con el fin de obtener clones que sobreexpresaran Cdc14b, su mutante inactivo (Cdc14b-PD), Cdc14a y el oncogén H-Ras de manera estable. Se observó que la sobreexpresión de Cdc14b de manera constitutiva da lugar a cambios morfológicos en las células. Éstas adquieren una apariencia fusiforme y refringente similar a la morfología inducida por el oncogén H-Ras (Figura 21 A) (Jacobsen et., 2002).

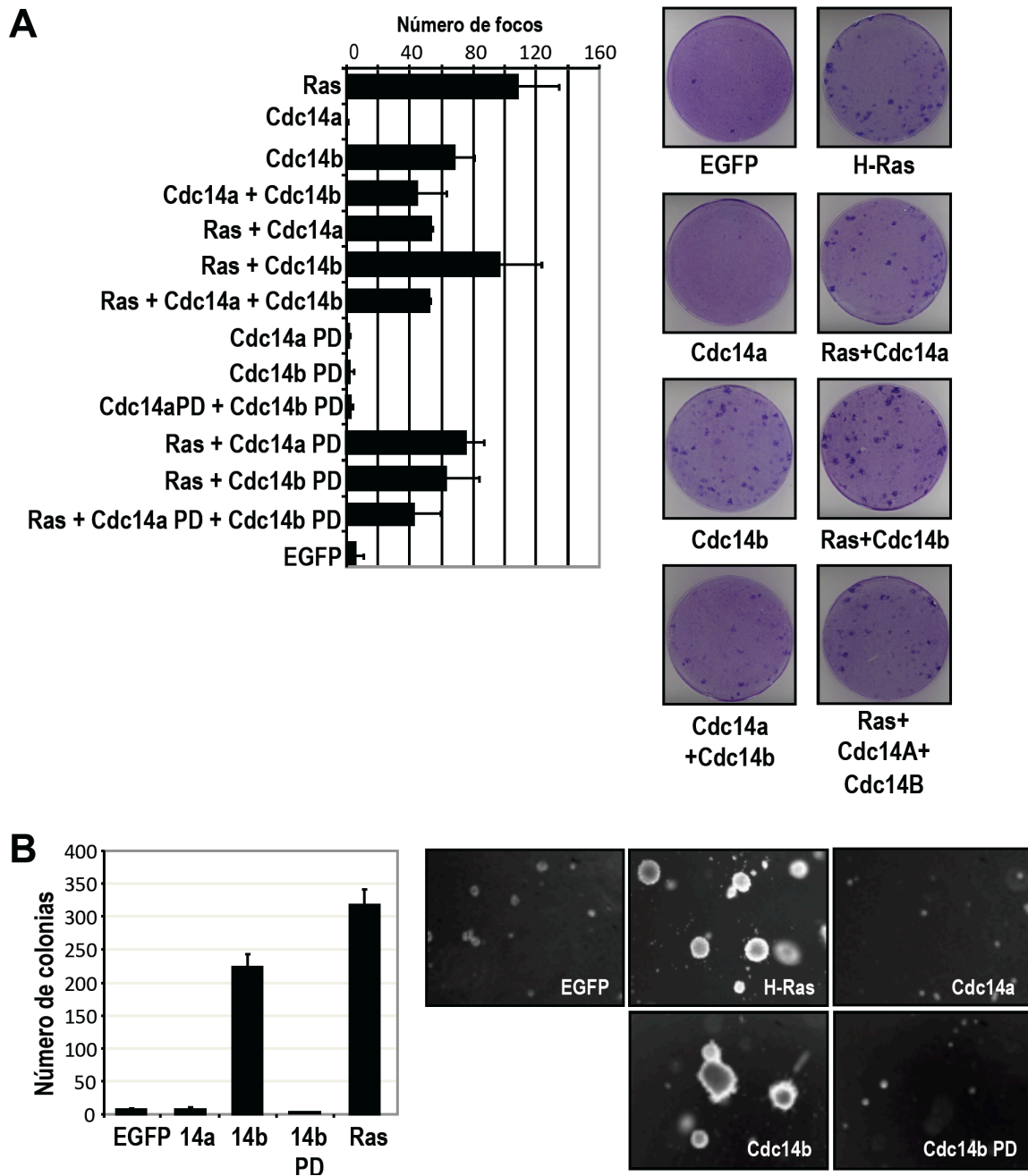


Figura 20. La sobreexpresión de Cdc14b induce una transformación oncogénica. (A) Ensayo de focos. Se sobreexpresó Cdc14b, Cdc14a, Ras, o las combinaciones de éstos en células NIH3T3 y tras 21 días se cuantificó la presencia de focos de células transformadas. La sobreexpresión de Cdc14b induce por sí misma la transformación oncogénica, no siendo así en el caso de su mutante inactivo. (B) Ensayo de formación de colonias en soft-agar. Las células que sobreexpresan Cdc14b son capaces de formar colonias en un medio semisólido.

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de Cdc14b induce una transformación lo suficientemente agresiva como para formar tumores in vivo, se inyectaron los clones que expresan las proteínas de manera estable en dos modelos de animales: ratones inmunosuprimidos SCID y embriones de pollo. En el primer caso se inyectaron las células en cada costado de los ratones inmunosuprimidos. A los diez días comenzó a observarse el crecimiento de masas tumorales. Las

células que sobreexpresan Cdc14b indujeron la formación de masas tumorales de crecimiento más lento que las inducidas por el oncogén H-Ras. Sin embargo, ni las células control, ni las células que sobreexpresan Cdc14a, ni las que sobreexpresan los mutantes inactivos dieron lugar a un crecimiento tumoral (Figura 21 B).

Por otro lado, se inyectaron estos clones estables en embriones de pollo y una semana después fueron fijados para analizar por inmunohistoquímica el crecimiento de estas células. Se inmunodetectó el marcador de proliferación Ki67 (el cual, en el embrión de pollo solo reconoce las células murinas 3T3) y se constató que solo las células que sobreexpresan Cdc14b y el oncogén H-Ras fueron capaces de crecer en dichos embriones de pollo.

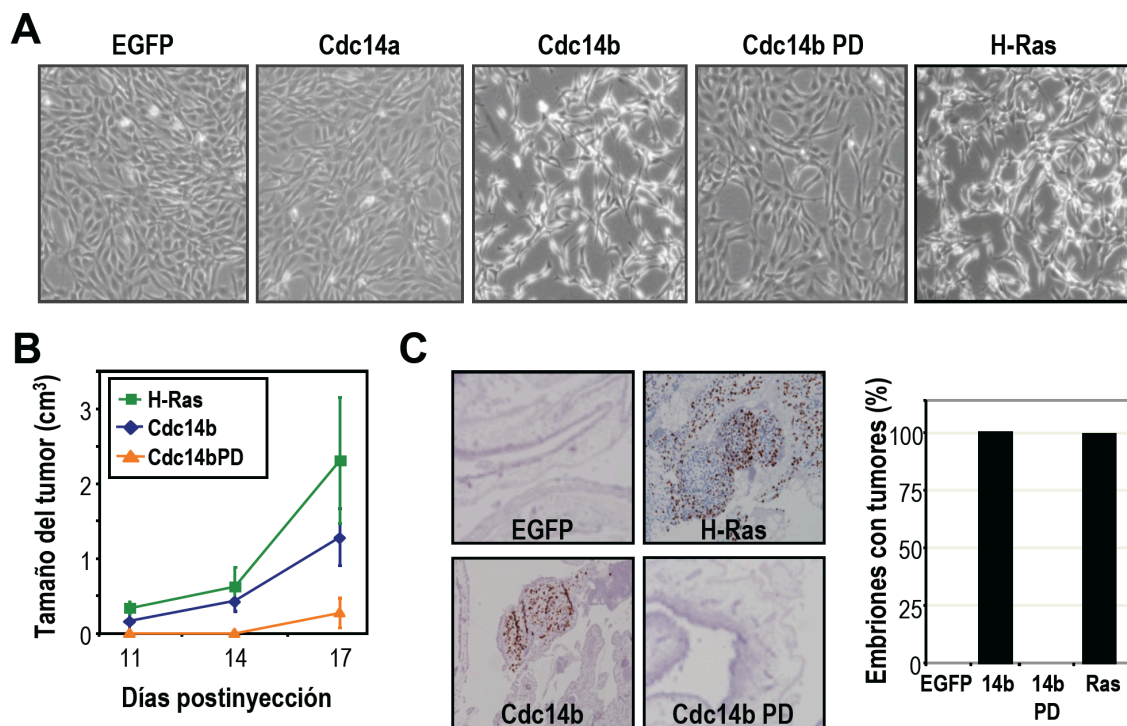


Figura 21. Las células que sobreexpresan Cdc14b generan tumores *in vivo*. (A) Transformación morfológica de las células que sobreexpresan Cdc14b de manera estable similar a las que sobreexpresan el oncogén H-Ras (B) Cuantificación de los xenotransplantes generados en ratones inmunosuprimidos SCID tras la inyección de 10⁶ células. (C) Inmunohistoquímica del marcador Ki67 de los xenotransplantes de pollo. Análisis de los xenotransplantes generados en embriones de pollo. Tanto en el cien por cien de los embriones a los que inyectamos las células que sobreexpresan Cdc14b de manera estable como los que inyectamos las que sobreexpresan el oncogén H-Ras desarrollaron tumores.

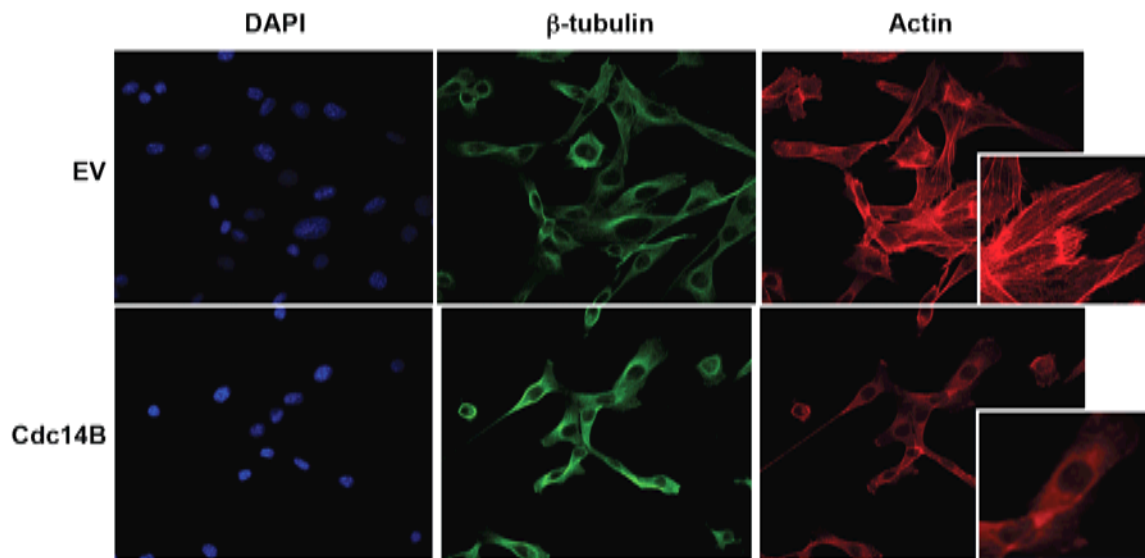
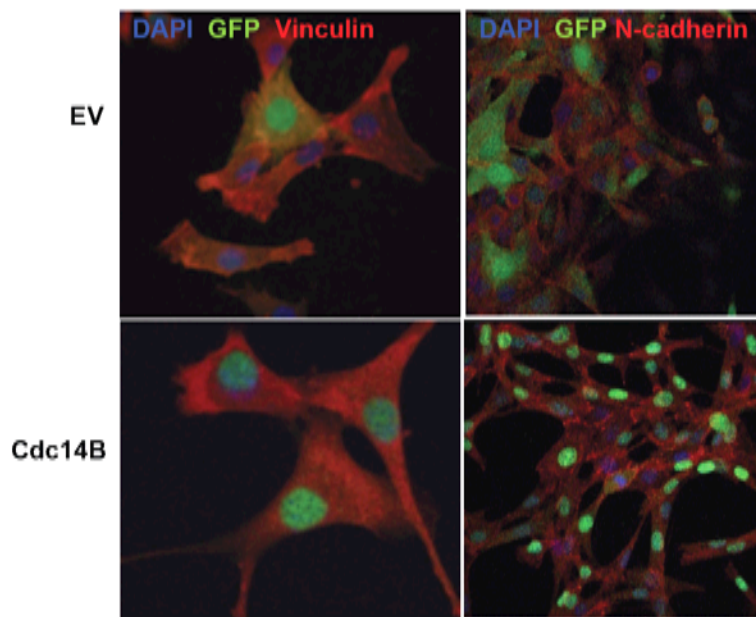
A**B**

Figura 22. Las células que sobreexpresan Cdc14b presentan alteraciones en su citoesqueleto. (A) Disminución de las fibras de estrés en las células que sobreexpresan Cdc14b (Rojo:actina, verde: β -tubulina, azul:DAPI). (B) Incremento de la vinculina y de la N-cadherina en las células que sobreexpresan Cdc14b. (Verde:Cdc14b/GFP, rojo: vinculina/N-cadherina, azul: DAPI)

4.1. La sobreexpresión de Cdc14b induce alteraciones en la motilidad.

Una de las características que presentan las células que sobreexpresan Cdc14b es la morfología refringente y fusiforme similar a la desarrollada por las células que sobreexpresan H-

Ras. Para analizar los cambios en el citoesqueleto que gobiernan dicha transformación y determinar de que manera Cdc14b está implicada en tales alteraciones, se analizó por inmunofluorescencia la organización del citoesqueleto de estas células a través de diversos marcadores: α -tubulina, γ -tubulina, tubulina acetilada, faloidina, N-cadherina y vinculina. No se observó ninguna anomalía en la en el patrón de distribución de las tubulinas, sin embargo las tinciones de faloidina de las células que sobreexpresan Cdc14b muestran una disminución en la cantidad de fibras de estrés en comparación con las células control (Figura 22A). Este hecho va acompañado de una disminución de la presencia de vinculina y por tanto de las adhesiones focales (Figura 22B). Por último, se observó que las células NIH3T3 que sobreexpresan Cdc14b muestran un incremento de N-Cadherina.

La N-cadherina es una proteína relacionada con el incremento de motilidad y de capacidad de invasión. Para analizar si la sobreexpresión de Cdc14b genera alteraciones en la motilidad celular se realizó un análisis mediante videomicroscopia de las células control y de las células que sobreexpresan Cdc14b y se cuantificó el movimiento que desarrolló cada célula. Las gráficas de la figura 23 A reflejan las trayectorias descritas por cada una de las células sometidas a este seguimiento. El análisis de las trayectorias reveló que las células que sobreexpresan Cdc14b sufren un incremento en la motilidad (que queda reflejado por el incremento de la longitud recorrida y de la velocidad media). Éste se acompaña de un incremento en la linealidad de su dirección y una disminución en las variaciones de velocidad. En contraposición, las células control ante los diversos estímulos del medio van cambiando de dirección y de velocidad continuamente (Figura 23B).

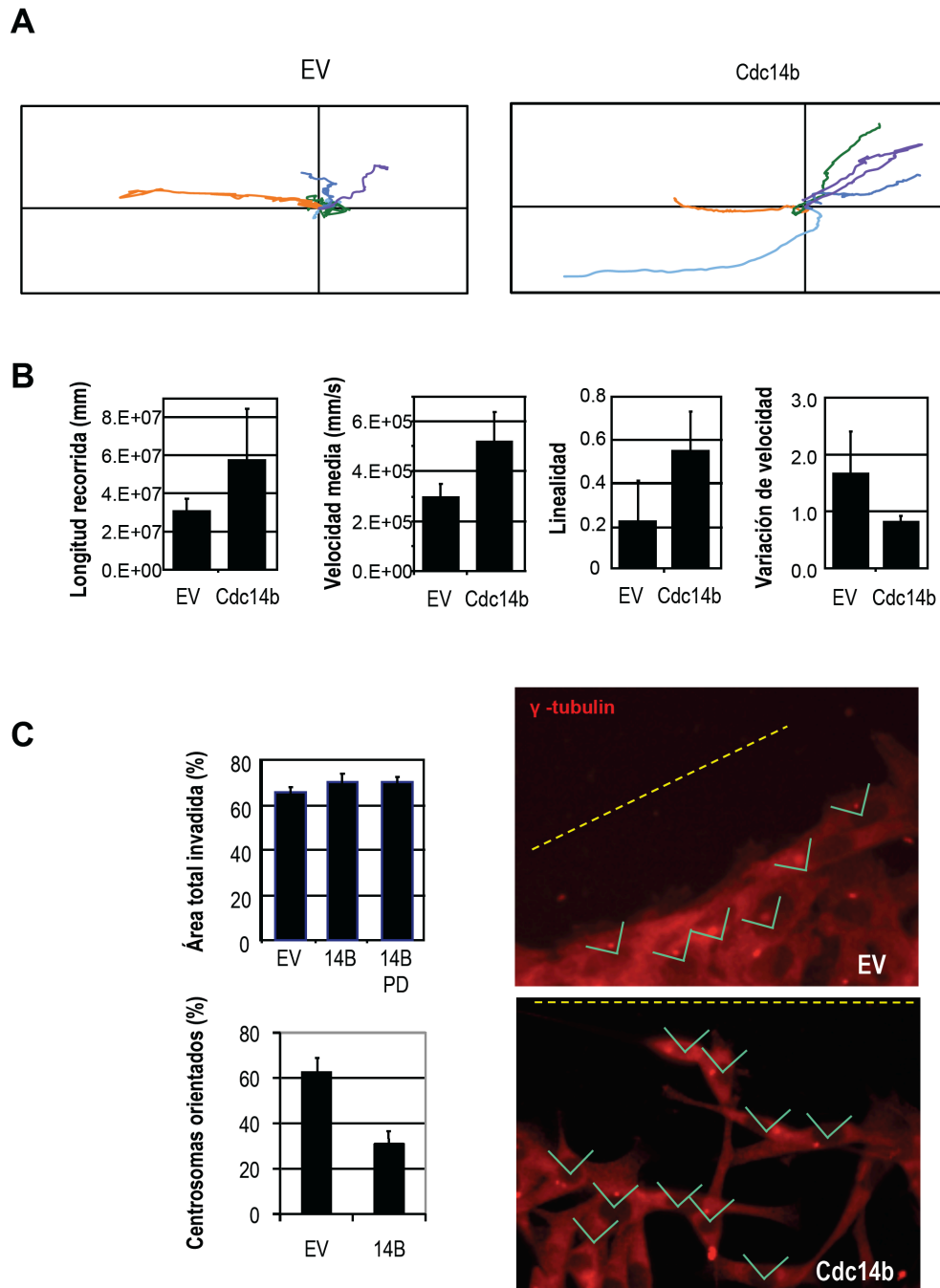


Figura 23. Las células que sobreexpresan Cdc14b presentan un incremento en la motilidad. (A) Diagrama de trayectorias de las células control y de las células que sobreexpresan Cdc14b. (B) Cuantificación del movimiento: longitud recorrida, velocidad media, linealidad y variaciones de velocidad. Las células que sobreexpresan Cdc14b presentan un incremento en la motilidad (longitud y velocidad media). Sin embargo, este movimiento es descontrolado, son incapaces de variar la velocidad o la dirección en función de los estímulos del medio (linealidad y variabilidad de velocidad). (C) Ensayo de formación de heridas. Cuantificación del área total invadida 20 horas después de generar la herida y de la orientación de los centrosomas hacia la herida. Imágenes representativas de las células del frente de la herida. Mientras la mayoría de las células control orientan sus centrosomas hacia la herida, la mayor parte de las células que sobreexpresan Cdc14b no lo hacen perdiéndose la compactación del frente.

Los resultados del análisis de las trayectorias sugieren que, si bien las células que sobreexpresan Cdc14b adquieren un incremento en la motilidad, dicho movimiento es descontrolado. Para comprobar este resultado se realizaron experimentos *in vitro* de cierre de heridas (Figura 23C). En contraposición a lo esperado dado el incremento en su motilidad, las células que sobreexpresan Cdc14b son capaces de cerrar las heridas con la misma velocidad que lo hacen las células control. Sin embargo, el análisis por videomicroscopía del desarrollo de este experimento nos mostró que mientras las células control avanzan todas ellas en un frente perfectamente ordenado, dirigidas a cerrar la herida, las células que sobreexpresan Cdc14b comienzan a moverse descontroladamente en todas las direcciones, desplazándose por la herida individualmente, de manera que se pierde el frente compacto que las células control mantienen. Dado que existe una correlación entre la posición del centrosoma y la dirección del movimiento de las células (Ueda et al. 1997), se realizaron inmunofluorescencias para la γ -tubulina y se analizó la orientación de los centrosomas de las células que constituyen el frente de la herida. Mientras en las células control un 62.5% de las células presenta los centrosomas orientados hacia la herida, tan solo un 31.7% de las células que sobreexpresan Cdc14b mantienen una orientación adecuada de su centrosoma. Todo ello nos indica que la sobreexpresión de Cdc14b induce una mayor motilidad de las células pero dicho movimiento es descontrolado.

4.2. La inhibición de la ruta de las quinasas MEK/ERK revierte el fenotipo de las células que sobreexpresan Cdc14b.

Con el fin de identificar de qué manera la fosfatasa Cdc14b genera todas estas alteraciones morfológicas que desencadenan un movimiento descontrolado, se trataron los clones que expresan Cdc14b de manera estable con distintas drogas para verificar si la inhibición de alguna ruta bioquímica revierte estas anomalías. Se comprobaron los efectos de un inhibidor de Ras (FIT-276), un inhibidor de RAC, un inhibidor de las quinasas ROCK, un inhibidor de las quinasas MEK/ERK (PD98059) y dos inhibidores distintos de PI3K (Wortmaninn y LY29002). De todos ellos, solamente se apreciaron reversiones del fenotipo en el caso del inhibidor de la farnesilación FIT-276 y de las quinasas MEK/ERK (Figura 24A). Además se comprobó que en presencia de estos inhibidores, la capacidad de estas células a crecer en soft-agar se ve comprometida (Figura 24 B). Dadas las similitudes de la transformación inducida por la sobreexpresión de la fosfatasa Cdc14b y dada la reversión del fenotipo de estas células ante la inhibición de la ruta de las quinasas MEK/ERK, nos planteamos analizar si Cdc14b interviene en la

transformación inducida por Ras. Para ello se transfectaron las células que expresan H-Ras de manera estable con dos tipos de plásmidos que codifican shRNA (pA90 y pPRIME) para la expresión de Cdc14b. A continuación se analizó si en estas condiciones las células son capaces de formar colonias en un medio semisólido de soft-agar. Finalmente se comprobó que tras la interferencia de Cdc14b, las células que sobreexpresan el oncogén H-Ras disminuyen su capacidad en la formación de colonias (reflejado mediante la disminución del número de colonias generado en esta ensayo) (Figura 24C).

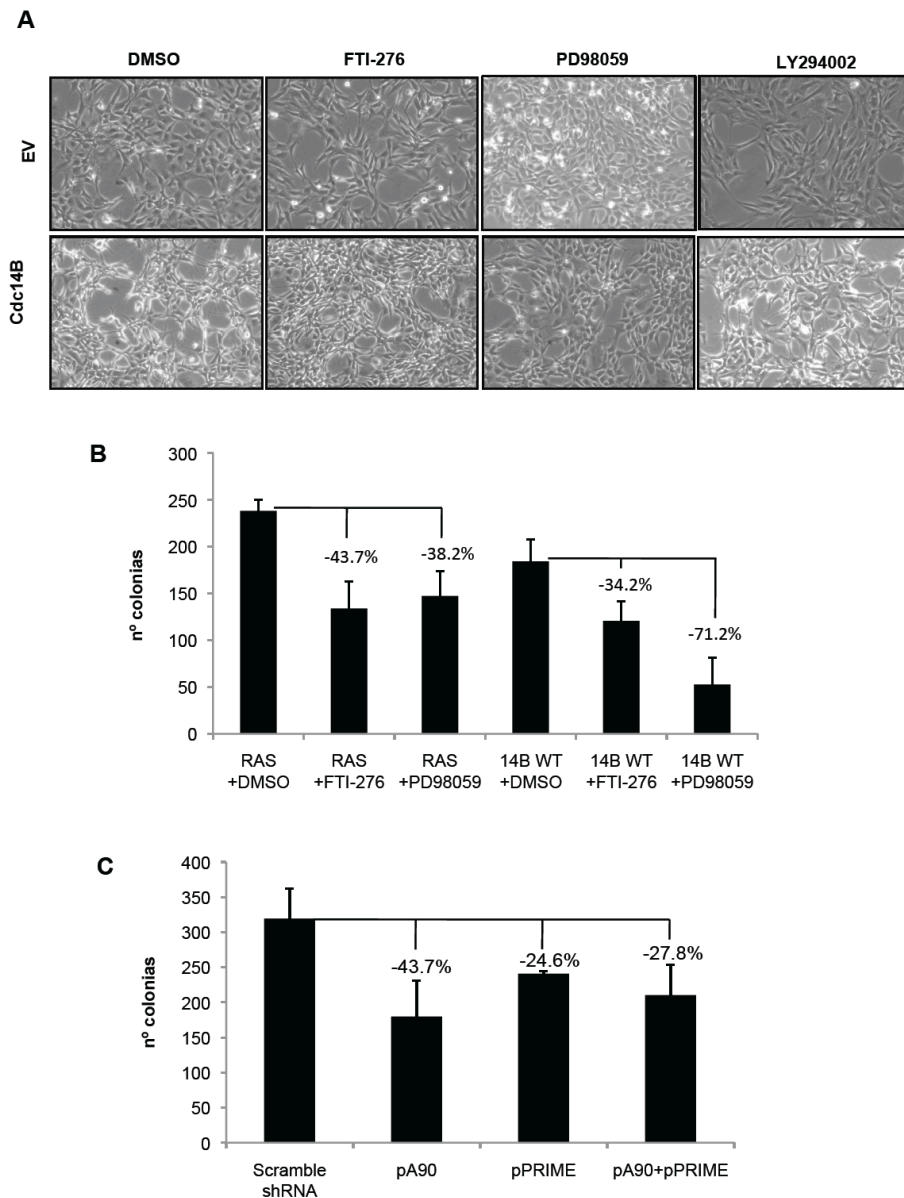


Figura 24. La inhibición de la ruta de las quinasas MEK/ERK revierte el fenotipo de la sobreexpresión de Cdc14b. (A) Fotografías de campo claro de la reversión del fenotipo ante los inhibidores de MEK/ERK. (B) Cuantificación de la formación de colonias de las células que sobreexpresan Cdc14b en presencia de estos inhibidores (C) Cuantificación de la formación de colonias de las células que sobreexpresan H-Ras interferidas para la expresión de Cdc14b.

4.3. El análisis de expresión de genes por microarrays revela elevadas similitudes entre las células que sobreexpresan Cdc14b y las que sobreexpresan H-Ras.

Tras todos estos resultados y con el fin de identificar las alteraciones bioquímicas generadas por la sobreexpresión de Cdc14b, se analizaron los perfiles de expresión de los genes de estas células mediante microarrays de expresión génica (Agilent). En la figura 25 se muestran los resultados del análisis SOTA, en el cual se pueden observar las diferencias de expresión génica de los diversos grupos de células estudiados. Es fácil advertir que existen muchas similitudes en el patrón de expresión de las células que sobreexpresan Cdc14b y las que sobreexpresan H-Ras.

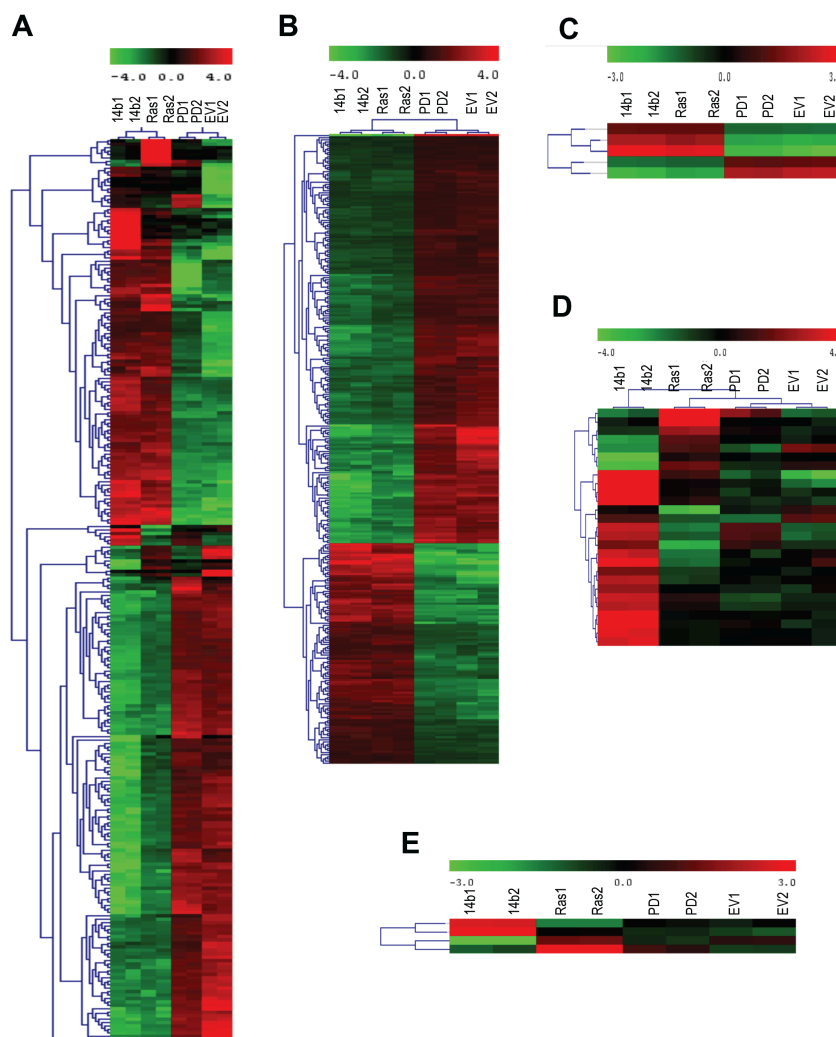


Figura 25. El análisis de los microarrays de los perfiles de expresión génica demuestran elevadas similitudes entre las células que sobreexpresan H-Ras y las que sobreexpresan Cdc14b. (A) Análisis SOTA (unbiased) de los genes que muestran cambios significativos en las distintas poblaciones celulares (wt1/wt2: Cdc14B; ras1/ras2: H-Ras; pd1/pd2: Cdc14B PD; ev1/ev2: vector vacío). (B) Análisis SOTA que representa las similitudes entre la sobreexpresión de Cdc14b y H-Ras. (C) Análisis FatiGO de los genes incluidos en B, a la derecha están representados cada uno de los genes de las cinco clases. (D) Análisis SOTA de los genes que muestran diferente expresión entre las células que sobreexpresan Cdc14b y H-ras. (E) Análisis FatiGO de los genes incluidos en D, a la derecha están representados cada uno de los genes de las cinco clases.

5. La ausencia de Cdc14b induce esterilidad en los ratones machos.

Los cruces entre los ratones homocigotos deficientes en Cdc14b no dieron ninguna descendencia; lo que indicó un posible problema de fertilidad en estos ratones. Con el fin de comprobar si la esterilidad afecta a las hembras, a los machos o a ambos, se cruzaron ratones deficientes en Cdc14b con ratones de genotipo silvestre. Finalmente se resolvió que, mientras las hembras deficientes en Cdc14b cruzadas con los machos control se quedan preñadas y tienen camadas de tamaño similar a las de los ratones silvestres, las hembras control cruzadas con machos deficientes en Cdc14b nunca se quedan preñadas. Es decir, los ratones machos deficientes en Cdc14b son estériles (ver tabla 7)

TABLA 7. Estudio de la esterilidad de los ratones deficientes en Cdc14b

Macho	Hembra	Nº cruces analizados	Nº cruces fértiles	Nº ratones medio por camada
<i>Cdc14b^{-/-}</i>	<i>Cdc14b^{+/+}</i>	8	0	-
<i>Cdc14b^{+/+}</i>	<i>Cdc14b^{-/-}</i>	8	8	9.6 ± 1.1
<i>Cdc14b^{+/+}</i>	<i>Cdc14b^{+/+}</i>	8	8	9.9 ± 1.2
<i>Cdc14b^{+/-}</i>	<i>Cdc14b^{+/-}</i>	8	8	9.4 ± 1.3

5.1. Estudio histopatológico de los testículos de ratones deficientes en Cdc14b.

Se sacrificaron ratones *Cdc14b^{-/-}* y ratones *Cdc14b^{+/+}* de diferentes edades con el fin de estudiar las posibles alteraciones del aparato reproductor masculino de los ratones estériles. Durante los primeros días de desarrollo, desde p1 hasta p14, las espermatogonias se dividen hasta llenar el lumen tubular y a continuación se diferencian en espermatocitos primarios, células más grandes que inician la meiosis. Hasta éste momento no se observan diferencias entre el desarrollo testicular de ratones de genotipo silvestre y ratones deficientes en Cdc14b. Las diferencias se aprecian con la aparición de las células postmeióticas (alrededor de p21).

La primera característica a resaltar es que los testículos de los ratones *Cdc14b^{-/-}* poseen menor tamaño que los de los ratones de genotipo silvestre y esta atrofia se incrementa con la edad (Figura 26). En segundo lugar, el estudio histopatológico reveló alteraciones en el epitelio seminífero de todos los ratones deficientes en Cdc14b analizados.

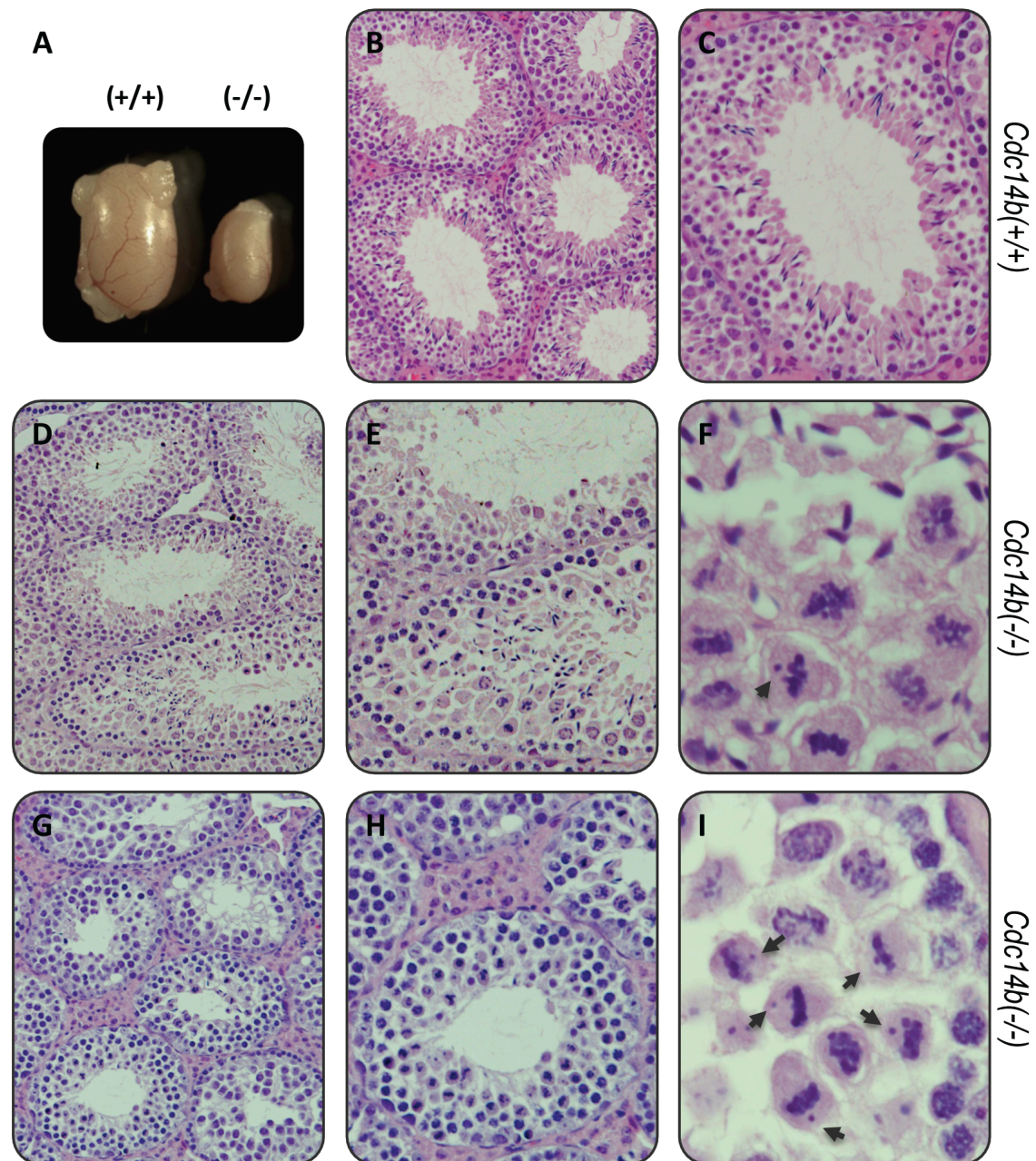


Figura 26. Atrofia testicular de los ratones deficientes en *Cdc14b*. (A) Comparación del tamaño testicular de un ratón de genotipo silvestre (+/+) y un ratón deficiente en *Cdc14b*^{-/-} de 12 semanas de edad. Tinciones de Hematoxilina Eosina de un testículo de un ratón de genotipo silvestre (B,C), de un ratón *Cdc14b*^{-/-} oligozoospermico (D, E, F) y de otro ratón azoospermico (G,H,I), todos ellos de 12 meses de edad. Las flechas indican la presencia de cromosomas univalentes en las metafases I.

Encontramos dos fenotipos distintos. El 60% de los ratones presenta oligozoospermia. En estos ratones, a pesar de que en los túbulos seminíferos encontramos todo tipo de células espermáticas: espermatogonias, espermatocitos, espermátides inmaduras y espermátides maduras; se observa una pérdida de la proporción de cada tipo celular, así como una pérdida de la

sincronía en las asociaciones celulares del epitelio seminífero. Por ejemplo, se observan túbulos donde las espermatídas redondas coexisten con espermatídas elongadas y con las maduras. Además, existe un incremento significativo del número de metafases y metafases aberrantes de los espermatocitos durante la primera división meiótica (Figura 27F), sincitios fruto de meiosis defectuosas (figura 26) y una marcada apoptosis en muchas de estas células (figura 29C). Como consecuencia, la producción de espermatozoides se ve comprometida. Esto queda reflejado en el epidídimo donde encontramos algunos túbulos vacíos (Figura 27B).

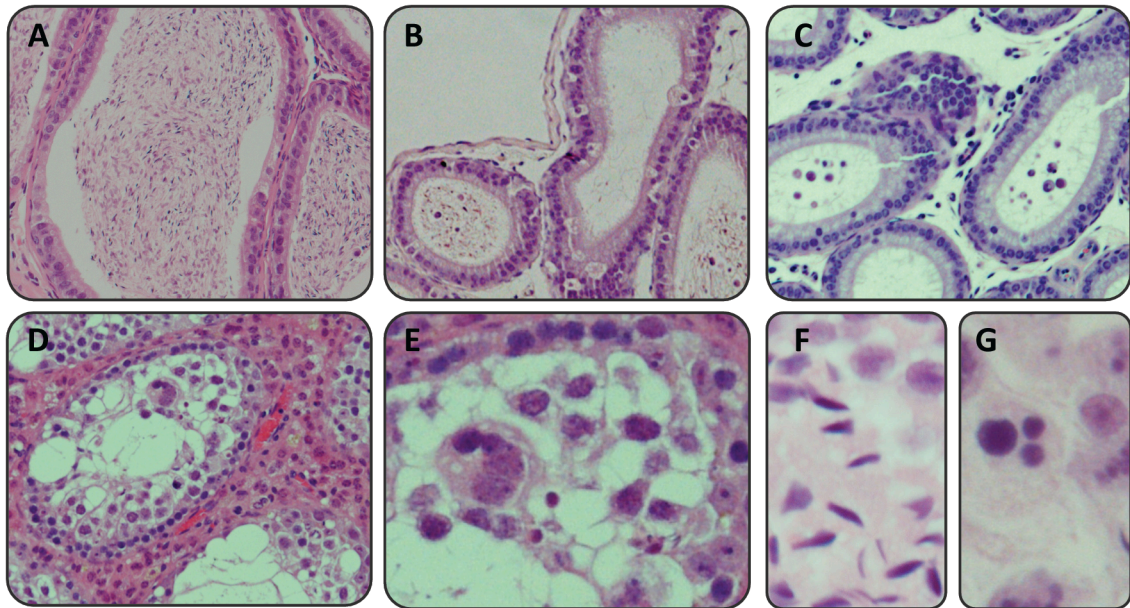


Figura 27. Producción de espermatozoides comprometida en los ratones deficientes en *Cdc14b*. Histologías de epidídimos de un ratón *Cdc14b*(+/+) (A), un ratón *Cdc14b*(-/-) oligozoospermico (B) y un ratón *Cdc14b*(-/-) azoospermico (C) de 12 semanas de edad. (D) Hiperplasia de las células de Leydig de un ratón *Cdc14b*(-/-) de 100 semanas de edad. (E) Detalle de un túbulo seminífero con alto grado de atrofia de la misma muestra que el anterior. (F) Detalle de la pérdida de la asincronía en el epitelio seminífero en un ratón *Cdc14b*(-/-) de 12 semanas de edad. (G) Detalle de un sincitio fruto de una meiosis aberrante en la misma muestra que el anterior.

El 40% de los ratones restante presenta un fenotipo similar, pero más agresivo, en el cual hay una ausencia total de células postmeióticas en los túbulos seminíferos (azoospermia). Al igual que en el caso anterior, se observa un elevado número de metafases, metafases aberrantes, sincitios procedentes de meiosis no finalizadas (Figura 26) y una apoptosis mayor (Figura 29C). En este caso, todas las células que comienzan la meiosis son incapaces de finalizarla adecuadamente y mueren por apoptosis. Por ello, en el epidídimo no hay espermatozoides (azoospermia) (Figura 27). Este fenotipo se agrava mucho más con el envejecimiento. Los testículos de ratones de dos años de edad presentan una marcada atrofia tubular caracterizada por una escasez de células

espermátogénas y en algunos casos calcificaciones tubulares e hiperplasia de las células de leydig. (Figura 27D).

Se utilizó un anticuerpo anti-Cdc14b para analizar la localización de esta fosfatasa en las células del testículo del ratón. Tal y como se ha descrito previamente en otras líneas celulares, Cdc14b se localiza en el núcleo de las células espermátogénas: espermatogonias, espermatocitos y espermátidas de los ratones de genotipo silvestre (Figura 28). Sin embargo, en los ratones *Cdc14b*^{-/-} se observa una ausencia total de la proteína.

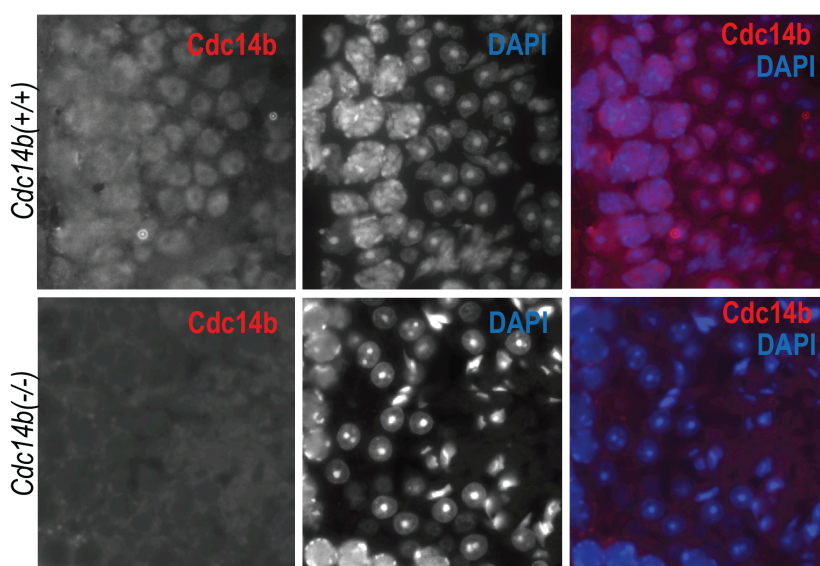


Figura 28. Localización nuclear de Cdc14b en las células espermátogénas. Inmunofluorescencias de un testículo de un ratón de genotipo silvestre y d un ratón deficiente en Cdc14b de 21 semanas de edad. En rojo se detecta Cdc14b y en azul el DNA.

Frecuentemente, los problemas en la meiosis desencadenan muerte celular por apoptosis y por tanto, atrofia testicular. Para valorar si la atrofia testicular de los espermatozoides deficientes en Cdc14b es debida a un incremento de la apoptosis en los túbulos seminíferos, se realizó un marcaje *in situ* del DNA fragmentado o técnica de T.U.N.E.L. (*TdT mediated dUTP nick end labelling*) en las secciones de parafina de los tejidos testiculares. Esta técnica marca las roturas del DNA internucleosomal típicas de la apoptosis, permitiendo identificar células apoptóticas en estadios más precoces a los detectados en las tinciones de hemotoxilina eosina. En comparación con los ratones de genotipo silvestre, tanto los ratones deficientes en Cdc14b oligozoospermicos como los azoospermicos, presentan un elevado número de células apoptóticas. La apoptosis es mayor en los ratones del fenotipo más agresivo (Figura 29C). Sorprendentemente, estas apoptosis se dan fundamentalmente en espermatocitos parados en metafase (Figura 29 D,E).

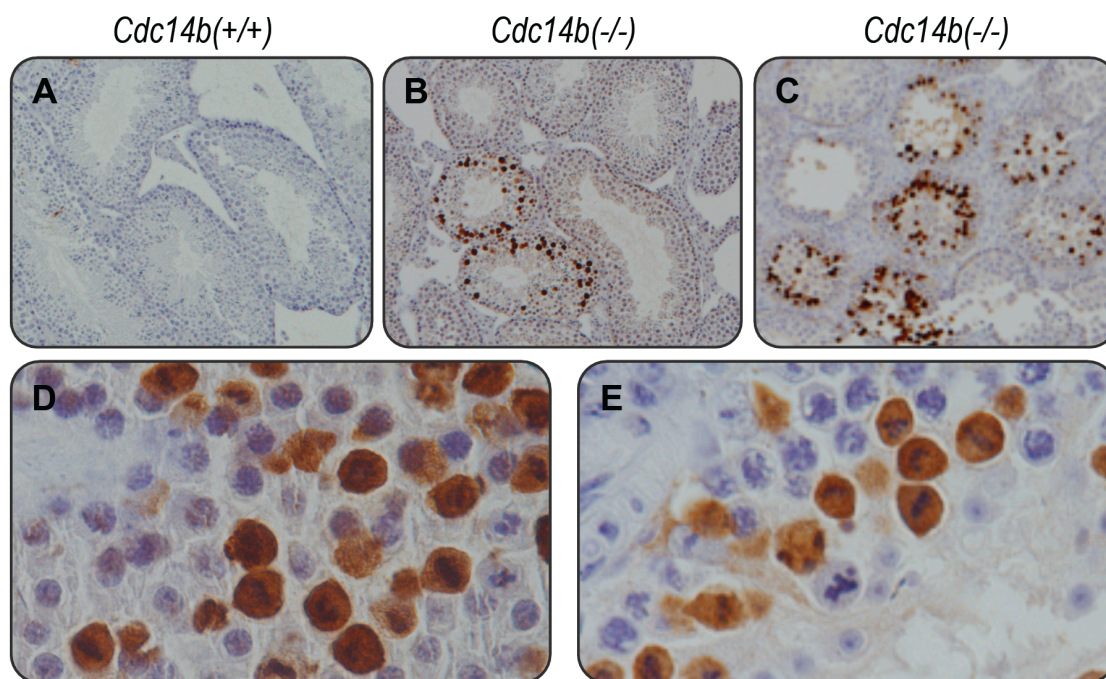


Figura 29. Apoptosis masiva en los túbulos seminíferos de los ratones deficientes en *Cdc14b*. T.U.N.E.L. de muestras de testículo de ratones de 12 semanas de genotipo silvestre (A), deficiente en *Cdc14b* oligozoospermico (B), y deficiente en *Cdc14b* azoospermico (C). Detalle de las células apoptóticas de B (D). Detalle de las células apoptóticas de C (E).

5.2. Los espermatoцитos primarios deficientes en *Cdc14b* presentan una meiosis I defectuosa.

Si prestamos atención a las metafases de los espermatoцитos primarios *Cdc14b*^{-/-}, es frecuente encontrar algún cromosoma desorientado, sin alinear en la placa metafásica (Figura 26D). Durante la primera división meiótica los cromosomas homólogos que debido a algún defecto en la formación del quiasma no mantienen una estructura tetrada, se separan y no son capaces de migrar a la placa metafásica, quedándose desorientados en el citoplasma. Estos cromosomas que no mantienen la estructura bivalente se les denomina cromosomas univalentes. Su presencia mantiene activo el SAC bloqueando la transición metafase-anafase y por tanto, la progresión en la meiosis I, pudiendo desencadenar finalmente rutas de apoptosis celular. Teniendo todo esto en cuenta, nos preguntamos si la apoptosis de los espermatoцитos primarios deficientes en *Cdc14b* se debe a la presencia de cromosomas univalentes. Para confirmar esta hipótesis y caracterizar en detalle el problema por el cual la espermatogénesis está comprometida en condiciones de ausencia de *Cdc14b*, se realizaron técnicas de esparcido de células espermatógenas y aplastado de túbulos seminíferos en colaboración con el grupo del Dr. José Ángel Suja.

Para analizar en detalle las metafases I de los espermatocitos primarios se realizaron inmunofluorescencias de los aplastados de los túbulos seminíferos. Estos estudios revelaron que, en el caso de los espermatocitos primarios deficientes en *Cdc14b*, tan solo el 6,5% de las metafases son normales ($n=1139$). Curiosamente, el 18,8% de las metafases presentan una pareja de cromosomas univalentes y el 74.7% son metafases apoptóticas (las cuales también presentan cromosomas univalentes). Estos resultados son significativamente distintos a los recuentos obtenidos de las células de los ratones de genotipo silvestre ($n=147$), en los que el 73,5% corresponde a metafases normales mientras que tan solo el 20,4% de las metafases son apoptóticas y tan solo el 6,1 % presenta algún cromosoma univalente (Figura 30).

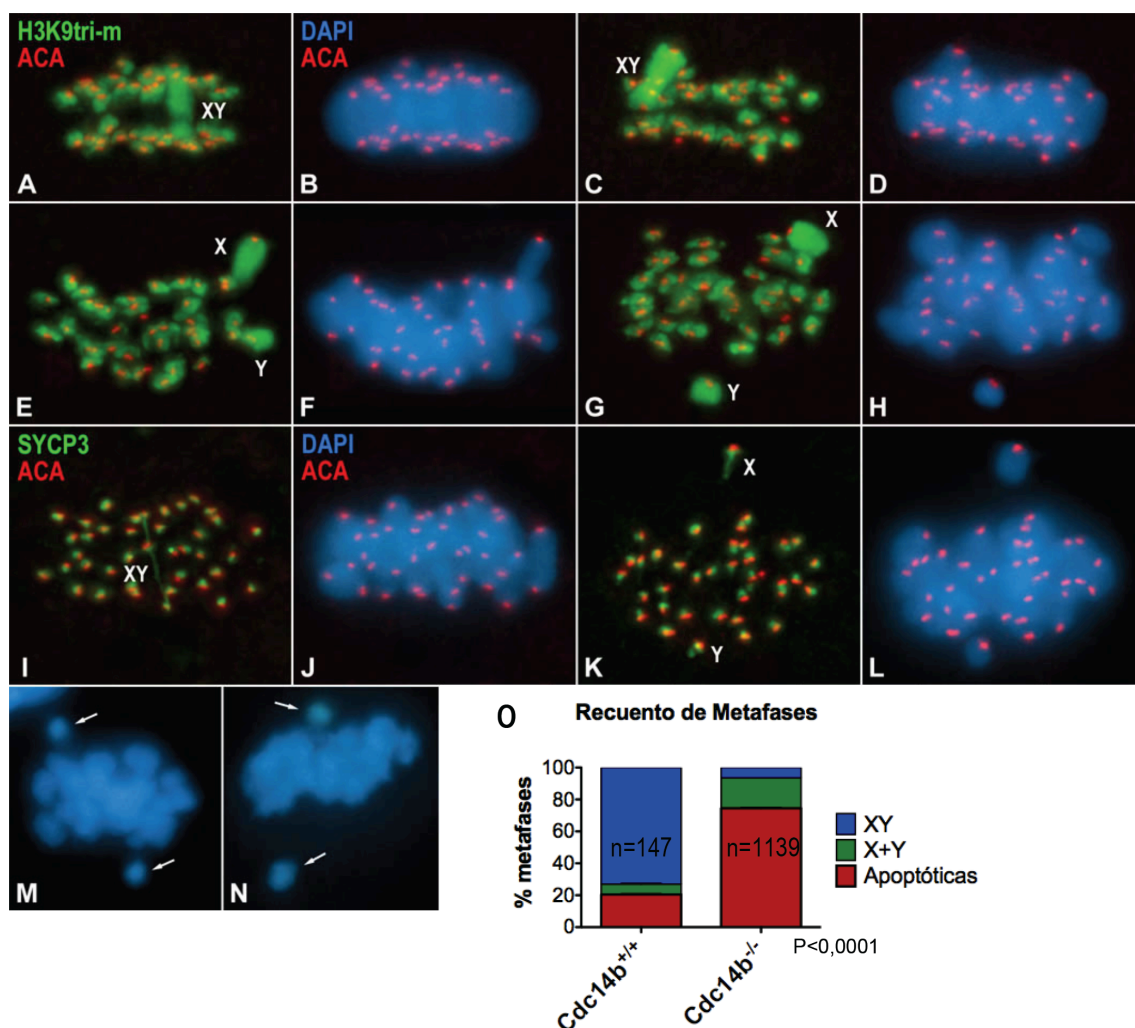


Figura 30. Presencia de los cromosomas sexuales univalentes en las metafases I de los espermatocitos *Cdc14b*^{-/-}. Inmunofluorescencia de las metafases I de dos ratones *Cdc14b*^{+/+} (A,B,C,D) y de dos ratones *Cdc14b*^{-/-} en los cuales se observan los cromosomas sexuales separados (E,F,G,H); (todos ellos de 14 semanas). (Verde: H3-k9-Tri-m, rojo: ACA, azul: DAPI). Inmunofluorescencia de una metafase I de un ratón *Cdc14b*^{+/+} (I,J) y un ratón *Cdc14b*^{-/-} en el cual se observan los cromosomas sexuales separados (K,L). (Verde: SYCP3, rojo: ACA, azul: DAPI). (M,N) Ejemplos de metafases I apoptóticas de un ratón *Cdc14b*^{-/-}. Las flechas señalizan los cromosomas sexuales univalente. (O) Recuento de las metafases que presentan los cromosomas sexuales unidos (XY), separados (X+Y) y metafases apoptóticas.

La Histona-3-lisina-9-trimetilada se localiza en la heterocromatina silenciada. En metafase I este tipo de histona se localiza en la zona del DNA adyacente a los centrómeros de los autosomas y en el caso de los cromosomas sexuales se localiza en todo su DNA. Por ello, estas inmunofluorescencias contra la Histona-3-K-9-trimetilada permitieron identificar que los cromosomas univalentes presentes en estas células, corresponden exclusivamente a los cromosomas sexuales, los cuales son detectados por este anticuerpo (Figura 30E,G).

De todo este análisis podemos concluir que en un 94% de los casos, los cromosomas sexuales de los espermatocitos deficientes en *Cdc14b* en metafase I se encuentran como univalentes bloqueando la progresión metafase-anafase, al igual que en otros modelos de ratón (Homer et al. 2005), la presencia de univalentes probablemente activa fuertemente el SAC y finalmente, desencadena la apoptosis de estas células.

La presencia de univalentes en metafase I puede deberse a problemas, o bien en la sinapsis y en la formación de los entrecruzamientos en los nódulos de recombinación, o bien a fenómenos de desinapsis precoz. Con el fin de estudiar en detalle el problema por el cual un elevado porcentaje de los cromosomas sexuales de los espermatocitos deficientes en *Cdc14b* llegan a metafase como univalentes, se realizaron inmunofluorescencias de los esparcidos de las células seminíferas de estos ratones marcando las proteínas que integran el complejo sinaptonémico; SCYP1 y SCYP3. Tras este análisis se concluyó que mientras al principio del paquiteno el porcentaje de cromosomas sexuales que no sinaptan es similar en ambos grupos de ratones, a medida que avanza el paquiteno, el porcentaje de cromosomas sexuales no sinaptados de los ratones deficientes en *Cdc14b* incrementa considerablemente. En diploteno un 37,6% (n=189) de los espermatocitos *Cdc14b*^{-/-} presentan los cromosomas sexuales univalentes en comparación con un 11,2% (n=107) de los espermatocitos *Cdc14b*^{+/+} (Figura 20). Curiosamente, a pesar de no sinaptar ambos cromosomas se encuentran próximos entre sí formando el cuerpo sexual (Figura 31F).

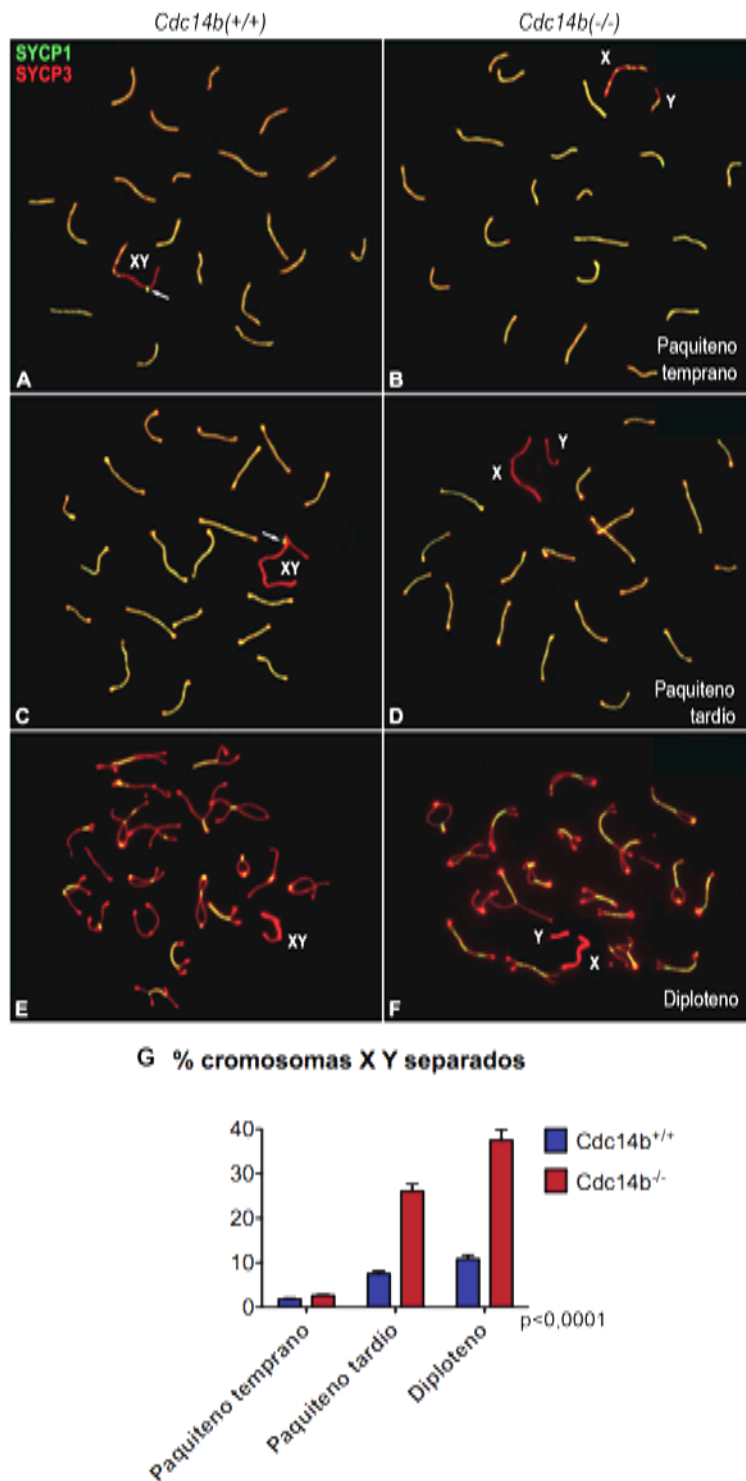


Figura 31. Desinapsis de los cromosomas sexuales de *Cdc14b*(-/-). Inmunofluorescencias de espermatocitos en paquitenio temprano, paquitenio tardío y diploteno de un ratón *Cdc14b*(+/+) (A,C,E) y un ratón *Cdc14b*(-/-) (B,D,F) de 14 semanas. Las flechas indican el punto de sinapsis de los cromosomas X e Y (verde: SYCP1, rojo: SYCP3). (G) Recuento del número de espermatocitos que presentan los cromosomas sexuales separados.

5.3. La fosfatasa Cdc14b es necesaria para el control del paquitenio.

El hecho de que la proporción de cromosomas sexuales univalentes incrementa considerablemente desde el paquitenio temprano hasta la metafase I, podría indicar un problema de desinapsis prematuro de estos cromosomas. El carácter heterólogo de la pareja sexual da lugar a que éstos tan solo sinapten por una pequeña porción de su DNA, lo que origina una asincronía de estos cromosomas con respecto de los autosomas (Wiltshire *et al.* 1995) y una mayor susceptibilidad a los problemas de recombinación y de desinapsis precoz.

Los espermatoцитos deficientes en ciclina A1 presentan una parada a nivel del diploteno, ya que el MPF no es activado eficientemente (Liu *et al.* 1998). Sin embargo, si estos espermatoцитos son cultivados *in vitro* en presencia de ácido okadaico (un inhibidor de fosfatasa), se induce la condensación de los cromosomas, el desensamblaje del CS y la progresión en la meiosis (Liu *et al.* 2000). Esto indica que en ausencia de ciclina A1, una desregulación del balance quinasa-fosfatasa favorece la activación del MPF y la progresión en la meiosis. Por tanto, el balance quinasa/fosfatasa es esencial en la regulación de la entrada en meiosis. Por otro lado, se ha descrito que, *in vitro*, el ácido okadaico inhibe fuertemente a las fosfatasas PP1 y PP2A, mientras que su efecto sobre Cdc14 es pequeño. No obstante, nos preguntamos si la deficiencia en Cdc14b contribuyera a una desregulación en el balance quinasa/fosfatasa similar a la inducida por dicho inhibidor y si dicha desregulación sería la causa de una entrada prematura en meiosis I. Para elucidar esta hipótesis se cruzó el modelo de ratón deficiente en Cdc14b con el modelo de ratón deficiente en ciclina A1. El análisis histopatológico de los testículos de los ratones *Ciclina A1^{-/-}; Cdc14b^{-/-}* reveló que la ausencia de Cdc14b en condiciones de deficiencia de ciclina A1 no tiene ninguna consecuencia en la progresión de la meiosis. De manera similar a lo que les ocurre a los ratones deficientes en ciclina A1, los ratones dobles *Knock out* para estas proteínas quedan parados en diploteno (figura 32).

En levaduras, las proteínas de la ruta de reparación del daño al DNA (*DDR, DNA damage repair*), Rad24, Rad17, Ddc1 y Mec1, están integradas también en la ruta del punto de control del paquitenio (Lydall *et al.* 1996). En estos organismos, si se combina una mutación que genera parada en paquitenio con una mutación en alguna de estas proteínas (como *dmc1* y Rad24) los mutantes se saltan dicha parada y entran en la primera división meiótica, acumulando defectos fruto de los problemas desencadenados en la recombinación homóloga. Por tanto, en el modelo deficiente en Cdc14b, un defecto en el punto de control del paquitenio también podría ser la causa de una desinapsis precoz del complejo sinaptonémico y de una entrada prematura en meiosis I.

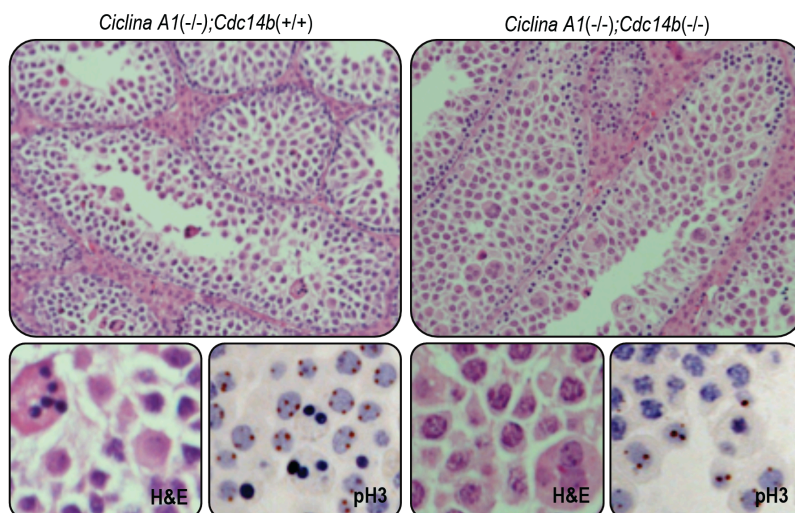


Figura 32. Parada en diploteno de los espermatocitos deficientes en ciclina A1 en ausencia de Cdc14b. Las hematoxilinas eosinas de un testículo de un ratón deficiente en Ciclina A1 y de un ratón deficiente en Ciclina A1 y Cdc14b no muestran diferencias en la progresión a través de la meiosis. Al igual que los espermatocitos deficientes en Ciclina A1, los espermatocitos dobles *Knock out* se paran en diploteno, momento en el que la Histona-H3 comienza a fosforilarse.

Para comprobar esta hipótesis nos valimos del modelo *Knock out* de Cdk2 (Ortega et al. 2003). En este modelo, los espermatocitos se quedan parados en paquitenio temprano y mueren por apoptosis debido a múltiples defectos como la no reparación de las rupturas del DNA, problemas en el anclaje de algunos telómeros a la envuelta nuclear, apareamientos y sinapsis incompletas y ausencia de la formación del cuerpo sexual (Viera et al. 2009). En el caso de que Cdc14b tuviera alguna función determinante en el control de la progresión del paquitenio, su ausencia en los espermatocitos dobles *Knock out* para Cdk2 y Cdc14b no se pararían en paquitenio eficientemente y llegarían a la primera división meiótica acumulando estas anomalías. Para comprobar esta hipótesis cruzamos ambos modelos de ratones con el fin de obtener ratones deficientes en Cdk2 y en Cdc14b (*Cdk2*^{-/-}, *Cdc14b*^{-/-}) y así analizar su transición por paquitenio, diploteno, diacinesis y primera división meiótica.

El análisis histológico de los testículos de los ratones deficientes en Cdk2 y Cdc14b reveló una apoptosis masiva de las células espermatógenas, similar a las de los ratones *Knock out* de Cdk2. Tal y como previamente se ha descrito, los ratones deficientes en Cdk2 presentan una gran atrofia testicular. Los túbulos seminíferos se encuentran parados en estadio IV de maduración, momento en el que abundan los espermatocitos en paquitenio. No se observan células espermatógenas mas tardías. En cuanto a figuras mitóticas, no se observan células ni en la primera ni en la segunda división meiótica, tan solo se aprecia alguna espermatogonia en mitosis, situada en la parte más basal del túbulo (Figura 33). Es interesante resaltar que en los ratones dobles *knock out* Cdk2 y Cdc14b, además de un predominio de espermatocitos en paquitenio, se aprecian

algunas prometafases y metafases apoptóticas, que podrían indicar este salto en el control del paquiteno y una entrada en la primera división meiótica (Figura 33).

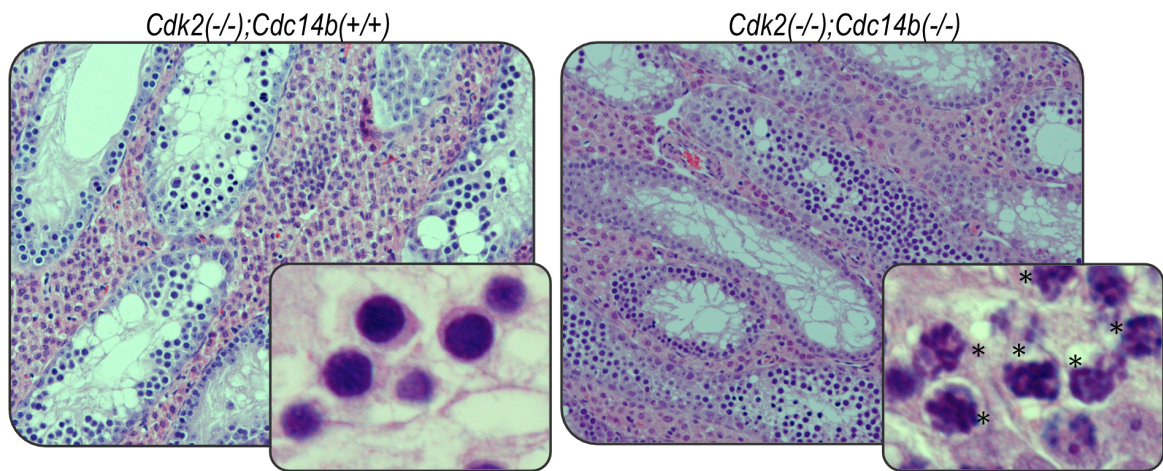


Figura 33. Histología de los ratones deficientes en Cdk2 y Cdc14b. Hematoxilina eosinas de un ratón *knock out* para Cdk2 cuya mayoría de los espermatoцитos están parados en paquiteno y un ratón doble *knock out* para Cdk2 y Cdc14b en el que además de espermatoцитos en paquiteno se observan algunas prometafases apoptóticas. (ambos de 8 semanas) Los asteriscos indican prometafases.

Con el fin de comprobar que en ausencia de Cdc14b los espermatoцитos deficientes en Cdk2 evaden el punto de control de paquiteno y progresan en la meiosis, se realizaron inmunofluorescencias utilizando como marcador de entrada en la primera división meiótica la fosfo-histona-H3. Ésta no se empieza a expresar hasta pasado el diploteno, cuando el complejo sinaptonémico se desmonta. *Viera et al.*, han descrito que los espermatoцитos deficientes en Cdk2 no reparan los DSB, de manera que las inmunofluorescencias de estos espermatoцитos parados en paquiteno, muestran elevados niveles de fosfo-histona γ -H2AX dispersa por todo su DNA. En el caso de que la deficiencia en Cdc14b indujera una evasión de este checkpoint, los espermatoцитos dobles *Knock out* progresarían en la meiosis acumulando los defectos que presentan en paquiteno. Por ello, se realizaron inmunofluorescencias para detectar la histona γ -H2AX y la fosfo-Histona-H3. En las muestras de los testículos de ratones dobles *Knock out*, además de presentar espermatoцитos en paquiteno con un marcaje de Histona- γ -H2AX similar al de los espermatoцитos en paquiteno deficientes en Cdk2, se encontraron numerosos espermatoцитos positivos para fosfo-histona-H3. Lo que sugiere que la parada de paquiteno está siendo evadida. Resulta muy interesante que estas figuras meióticas (presumiblemente paradas en metafase I) positivas para fosfo-histona-H3 también lo son para fosfo-Histona- γ -H2AX (Figura 34). Todo ello sugiere que la ausencia de Cdc14b en los espermatoцитos deficientes en Cdk2 promueve la evasión del punto de control de paquiteno, de manera que dichos espermatoцитos progresan en la meiosis y entran en la primera división meiótica acumulando los daños generados en las etapas previas.

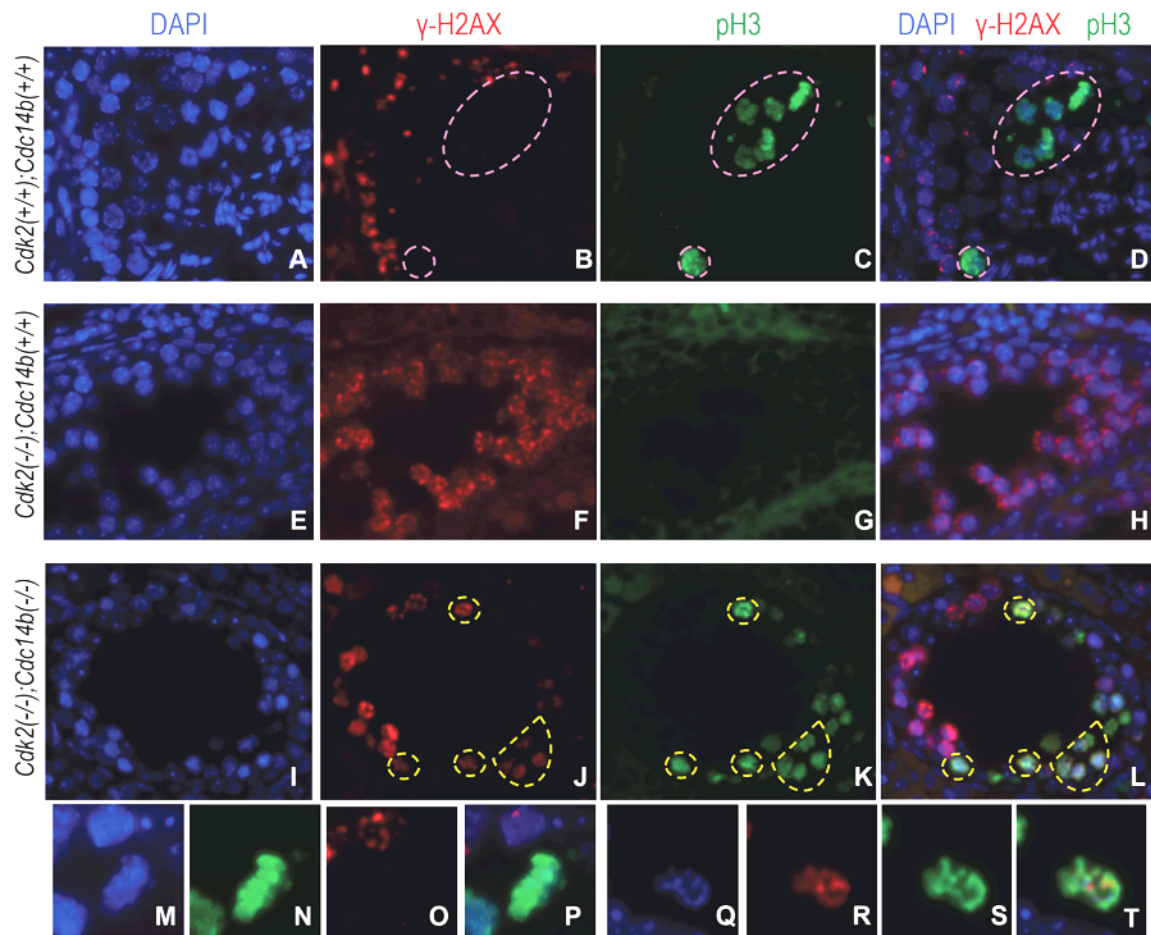


Figura 34. Evasión de la parada de paquitenio de los espermátocitos *Cdk2*^{-/-};*Cdc14b*^{-/-}. Inmunofluorescencias de los túbulos seminíferos de un ratón de *Cdk2*^(+/+);*Cdc14b*^(+/+) (A,B,C,D), un ratón *Cdk2*^(-/-);*Cdc14b*^(+/+) (E,F,G,H) y un ratón *Cdk2*^(-/-);*Cdc14b*^(-/-) (I,J,K,L) todos ellos de 8 semanas. El punteado rosa indica las metafases I negativas para el marcador de daño al DNA γ -H2AX (control) y el punteado amarillo las metafases y prometafases I positivas para dicho marcador en las muestras del ratón deficiente en *Cdk2* y *Cdc14b*. (azul: DAPI, verde: fosfohistona-H3, rojo: γ -H2AX). Detalle de una metafase I de un espermátocito control (M,N,O,P) y de un espermátocito deficiente en *Cdk2* y *Cdc14b* (Q,R,S,T).

5.4. La fosfatasa *Cdc14b* es esencial en la espermiogénesis.

En los aplastados de los túbulos seminíferos de los ratones deficientes en *Cdc14b* además de los problemas en la metafase I, también se observaron algunas anomalías en las células postmeióticas. Por una lado se identificó la presencia de microespermátidas (que representan un $5,9\% \pm 2,6$ respecto del total de las espermátidas redondas) y por otro lado se determinó que un $81,9\% \pm 9,5$ de los núcleos de las espermátidas elongadas poseen una morfología aberrante. (Figura 35E). De acuerdo al estudio histopatológico, un 60% de los ratones machos deficientes en

Cdc14b son capaces de producir espermatozoides, sin embargo, en el ensayo de fertilidad se demostró que todos los ratones son estériles. Por todo ello, nos preguntamos si la ausencia de Cdc14b también afecta a la maduración de la espermatidas y a la formación de los espermatozoides. Para analizar posibles defectos en la espermiogénesis, en primer lugar se realizó un recuento del número de espermatozoides en el epidídimo y se comprobó que el número de espermatozoides de las muestras recogidas de los ratones *Cdc14b*^{-/-} es significativamente menor que los recogidos en muestras de ratones de genotipo silvestre (oligospermia) (Figura 35 A).

A continuación, se analizó la movilidad de los espermatozoides y se comprobó que mientras en las muestras control la mayor parte de los espermatozoides se mueven avanzando linealmente, la mayor parte de los espermatozoides deficientes en Cdc14b no se mueven o tan solo presenta un ligera vibración de la cola (Figura 35 B). Se clasificaron los espermatozoides en tres grupos de acuerdo a su motilidad: los que mueven su flagelo y avanzan linealmente, los que presentan una ligera vibración flagelar pero no avanzan y los que no se mueven. En las muestras de los ratones de genotipo silvestre un 43% de los espermatozoides se mueve avanzando linealmente, un 38% presentan un movimiento vibratorio de la cola pero no avanzan y tan solo un 19% no se mueven. En las muestras recogidas de los ratones deficientes en Cdc14b tan solo un 3% de ellos avanza linealmente, mientras que el 32% presenta una ligera vibración flagelar y el 65% de los espermatozoies no se mueve. Por tanto estos espermatozoides presentan también astenozoospermia.

El estudio de la morfología de los espermatozoides extraídos del epidídimo mediante inmunofluorescencia confirmó aberraciones en la morfología nuclear (teratozoospermia). Se tomaron imágenes de núcleos marcados con DAPI y se analizó con el software de Metamorf las diferencias en el tamaño y la intensidad de estos núcleos (Figura 35 C,D,E). Las diferencias en la morfología, tamaño e intensidad de los núcleos de los espermatozoides indican defectos la fase acrosómica de la espermiogénesis en la que el DNA se condensa, el núcleo pierde volumen y el complejo acroplaxoma- acrosoma-manchette (AAM) da forma al núcleo. En el caso de los espermatozoides de ratón, el núcleo adquiere una forma característica de hoz. Sin embargo, tan solo 18% de los espermatozoides deficientes en Cdc14b presenta esta morfología, mientras que la gran mayoría de ellos (82%) presentan núcleos de morfología variada. (Figura 35 C,D,E).

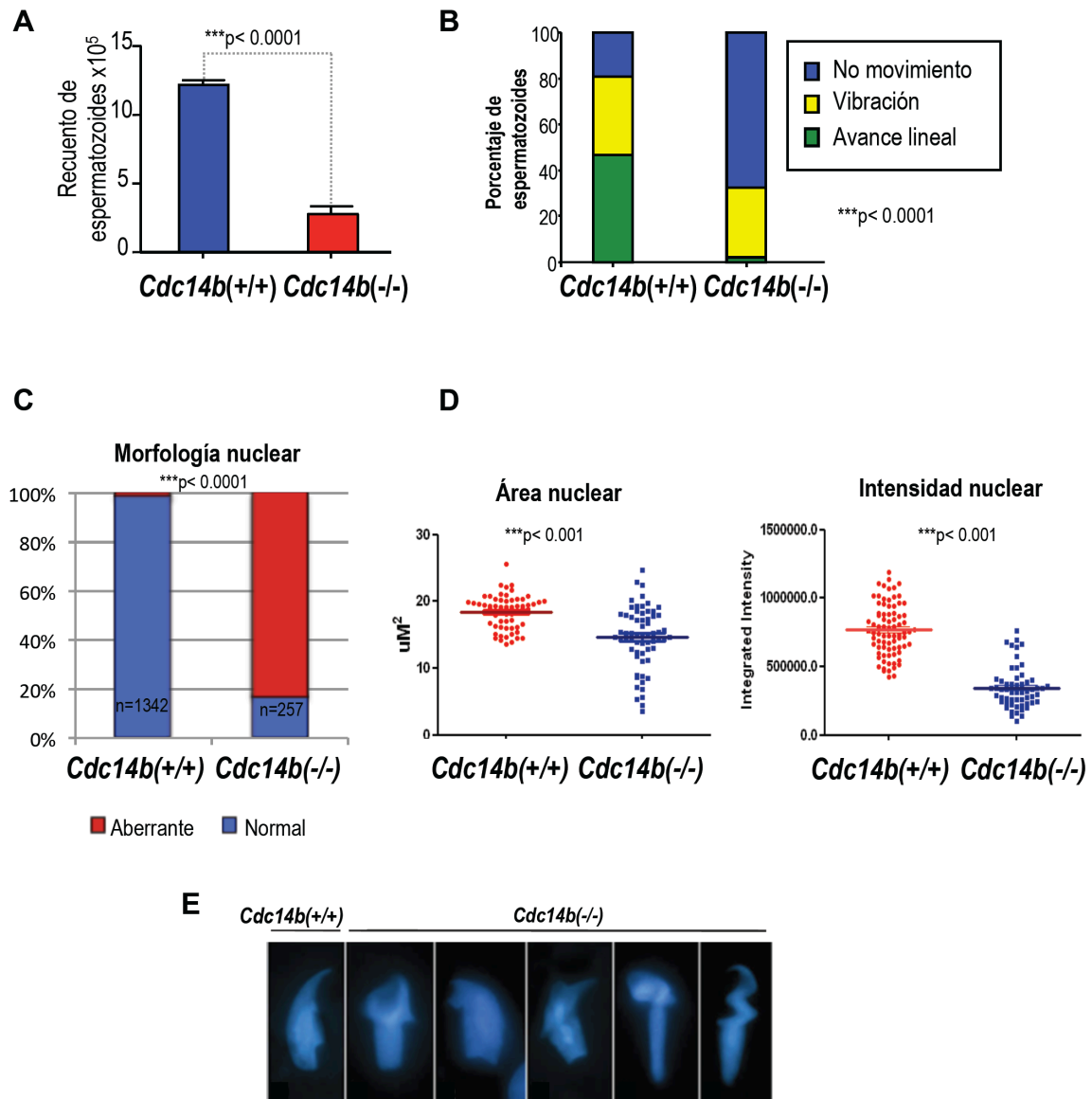


Figura 35. Los espermatozoides deficientes en *Cdc14b* presentan oligoastenoteratozoospermia. (A) Recuento del número de espermatozoides. Se extrajo una porción del epidídimo y se sumergió en 500 μL de medio M2. A continuación se contabilizaron los espermatozoides en cámara de Neubauer (se analizaron 8 ratones de cada genotipo). (B) Análisis de la motilidad de los espermatozoides contabilizados en el experimento anterior. Se determinó el número de espermatozoides con movimiento lineal, con una ligera vibración de la cola que no genera desplazamiento y sin ningún tipo de movimiento para cada genotipo. (C) Recuento del número de núcleos aberrantes observados en inmunofluorescencias de los espermatozoides extraídos del epidídimo (se analizaron 3 ratones de cada genotipo). Se utilizó DAPI como marcador. (D) Análisis del área nuclear y de la intensidad nuclear de las imágenes obtenidas por inmunofluorescencias con el software Metamorf. (E) Ejemplos de las inmunofluorescencias de los núcleos de los espermatozoides de ratones control y de ratones deficientes en *Cdc14b* (azul: DAPI)

Los problemas estructurales en la formación del axonema del flagelo o las anomalías en las estructuras periaxonemales originan problemas en el movimiento de éste. Dado el importante defecto en la motilidad de los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-}, se realizaron inmunofluorescencias de los marcadores del cuello y de la cola para comprobar si existe algún defecto morfológico en ellos.

Ni el patrón de localización de la α -tubulina (marcador del axonema de la cola) ni de la γ -tubulina (marcador del centrosoma y del axonema de la cola) mostraron diferencias entre los espermatozoides *Cdc14b*^{+/+} y los *Cdc14b*^{-/-}. La acetilación de la tubulina es esencial en la formación de las estructuras axonémicas. Además, se ha descrito que la deacetilasa de tubulina SIRT2 es un sustrato de *Cdc14b* (Dryden et., 2003). Por ello, para comprobar si existen defectos en la acetilación de la tubulina del axonema de los ratones deficientes en *Cdc14b*, se realizaron inmunofluorescias frente a este marcador. Sin embargo, tampoco se encontró ninguna anomalía. Curiosamente, mediante el marcaje con el Mitotracker®, se observó que algunos espermatozoides *Cdc14b*^{-/-} presentan mitocondrias deslocalizadas en la cabeza (Figura 36). Además, sorprendentemente en todas las preparaciones de espermatozoides *Cdc14b*^{-/-} se encontraron algunos espermatozoides decapitados y otros con la cola enredada en forma de ovillo alrededor de la cabeza.

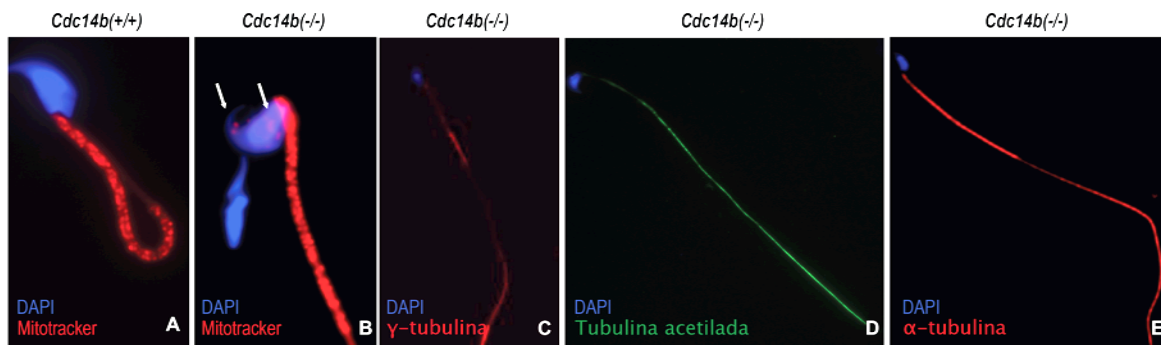


Figura 36. Localización aberrante de las mitocondrias de los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-}. Imágenes de las inmunofluorescias de los espermatozoides deficientes en *Cdc14b* extraídos del epidídimo. (A) Localización de las mitocondrias en el cuello de un espermatozoide control. (B) Presencia de mitocondrias deslocalizadas en la cabeza de los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-} (Rojo: mitotracker, azul: DAPI). (C) Distribución normal de la γ -tubulina en los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-}. (Rojo: γ -tubulina, azul: DAPI). (D) Distribución normal de la tubulina acetilada en los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-}. (Verde: tubulina acetilada, azul: DAPI). (E) Distribución normal de la α -tubulina en los espermatozoides *Cdc14b*^{-/-}. (Rojo: α -tubulina, azul: DAPI).

Dado que los problemas en el movimiento flagelar de los espermatozoides se deben principalmente a defectos en la estructura del axonema y de las estructuras periaxomales, se analizaron dichas estructuras mediante microscopía electrónica y se constató que los ratones deficientes en *Cdc14b* no presentan ninguna anomalía en las estructuras que constituyen el flagelo (Figura 37).



Figura 37. Desacoplamiento entre la cabeza y la cola en los espermatozoides deficientes en Cdc14b. Imágenes de microscopía electrónica de espermatozoides *Cdc14b*(-/-). (A) El axonema muestra una estructura normal (9+2). (B) Espermatozoide decapitado con un replegamiento de la cola. (C) Espermatozoide decapitado con una deslocalización del centrosoma y de las mitocondrias.

Para analizar en detalle la morfología celular de los espermatozoides deficientes en *Cdc14b* y entender los problemas estructurales que impiden su motilidad, colaboramos con el grupo del Dr. *Abraham Kierzenbaum*, expertos en espermiogénesis. Las imágenes de microscopía electrónica de las espermátidas de los túbulos seminíferos y de los espermatozoides del epidídimo revelaron diversas anomalías. El núcleo de las espermátidas redondas desarrollan prolongaciones denominadas nucleopodos y defectos en el desarrollo del acrosoma y de la *manchette* (Figura 38). Las espermátides elongadas presentan una contracción a nivel del anillo marginal del acroplaxoma que estrangula al núcleo por encima del anillo perinuclear de la *manchette*. Dado que el complejo acroplaxoma- acrosoma-manchette (AAM) juega un papel fundamental en la evolución de la forma de la cabeza durante la maduración de las espermátidas (*Kierszenbaum et Tres, 2004*), estos defectos podrían explicar las anomalías observadas en la morfología nuclear. Además el anillo marginal del acroplaxoma en el mutante de *Cdc14b* es anormal y carece de filamentos intermedios de queratina 5 o el número de filamentos está muy reducido. Las espermátidas maduras de la luz del tubo seminífero muestran una separación a nivel del aparato acoplador cabeza-cola (*head-tail coupling apparatus*; HTCA) (Figura 38). Por último, en el epidídimo se observa una dislocación de la cabeza del espermatozoide y una tendencia de la cola a rodear la cabeza en forma de ovillo.

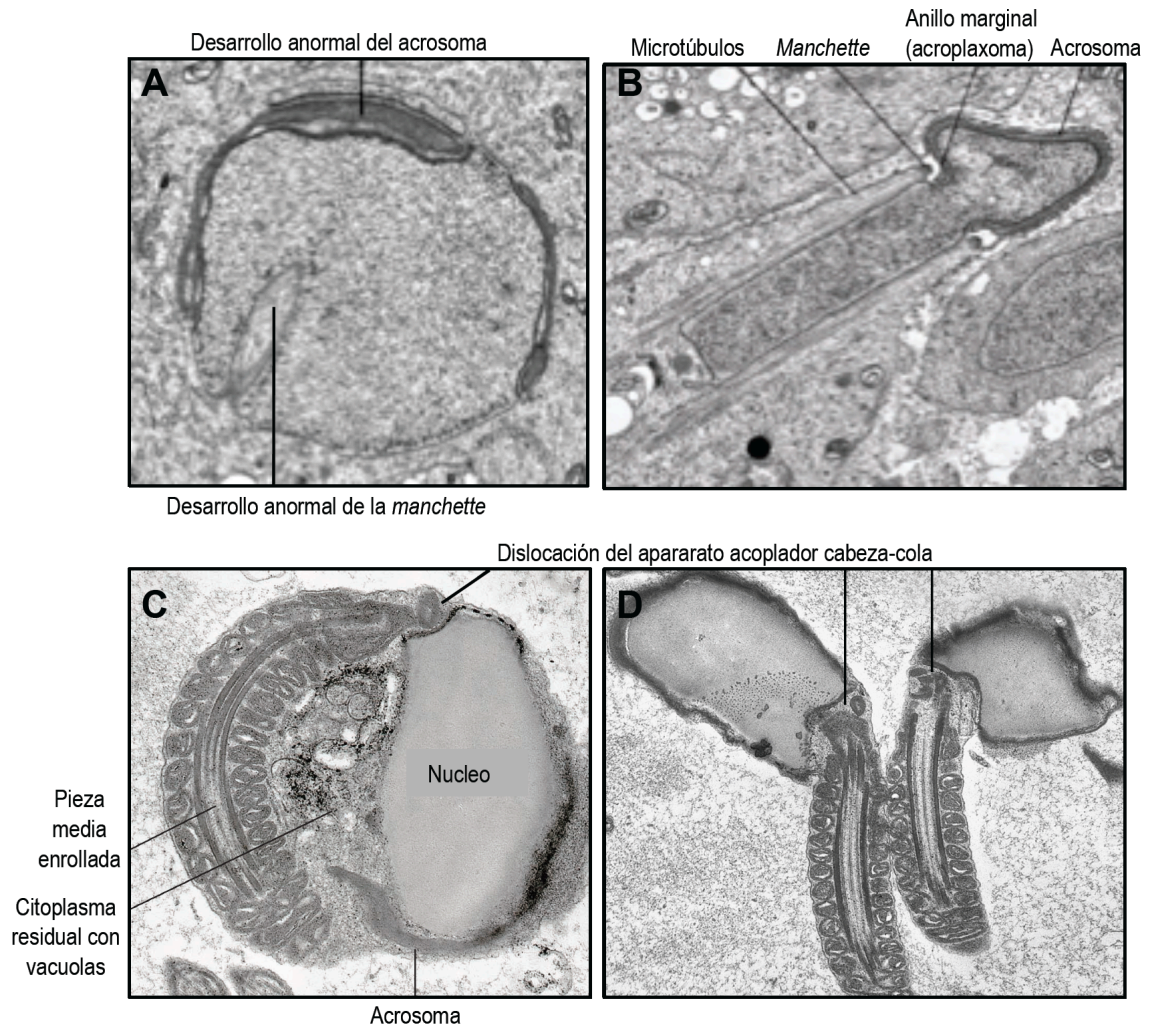
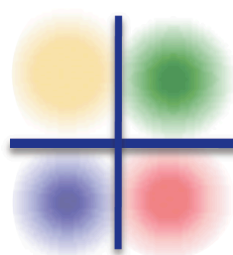


Figura 38. Defectos en la maduración de las espermátidas deficientes en Cdc14b. Imágenes de microscopía electrónica representativas de las anomalías encontradas en la maduración espermática de los espermatozoides deficientes en Cdc14b. (A) Las espermátidas redondas presentan un desarrollo anormal del acrosoma y de la *manchette*. (B) Las espermátidas elongadas sufren un estrangulamiento del núcleo por encima del anillo perinuclear de la *manchette*. (C) Ejemplo de dislocación del aparato acoplador cabeza-cola y enrollamiento de la pieza intermedia. (D) Ejemplo de dislocación del aparato acoplador cabeza-cola.



Discusión

DISCUSIÓN

En las células eucariotas, la fosforilación-desfosforilación es un mecanismo de control fundamental en múltiples procesos celulares como el metabolismo, la transcripción, la traducción, la reorganización del citoesqueleto, la motilidad, la estabilización de proteínas, el ciclo celular y la apoptosis. Su importancia radica en que induce un cambio conformacional en la proteína rápido y reversible, atribuyéndole una característica dual que está sujeta a un control. Por ejemplo: activación/desactivación, estabilidad/inestabilidad, unión/separación... Por tanto, el balance de actividad quinasa/fosfatasa es el que determina si este mecanismo a modo de interruptor se encuentra encendido o apagado. El hecho de que en el genoma humano encontramos 518 quinasas y tan solo 147 fosfatasas (Alonso et al. 2004; Manning et al. 2002), y que en ensayos *in vitro*, éstas parezcan ser poco específicas, llevaron a pensar que las fosfatasas simplemente actúan manteniendo unos niveles basales de actividad, siendo la actividad de las quinasas la que regula el comportamiento celular en muchos procesos como el ciclo celular. Sin embargo, si las quinasas del ciclo celular han sido valoradas como “los motores” que permiten a la célula avanzar por cada una de sus fases, resulta paradójico considerar a las fosfatasas como simples compañeras antitéticas cuyo papel se limite a mantener una actividad basal constante. Así, en los últimos años, se ha profundizado en los mecanismos que regulan la actividad y especificidad de las fosfatasas, permitiéndonos atribuirles una mayor implicación en la regulación del ciclo celular (Bollen et al. 2009; De Wulf et al. 2009; Queralt and Uhlmann 2008; Trinkle-Mulcahy and Lamond 2006).

La fosfatasa Cdc14 fue descubierta en el estudio de genes mitóticos llevado a cabo por el Dr. Hartwell en 1973. Sin embargo, no fue hasta 1998 cuando fue identificada como una fosfatasa esencial en la salida de mitosis de levaduras (Visintin et al. 1998). A pesar de que la familia de las fosfatasas Cdc14 mantiene una elevada homología estructural, existen diferencias entre las funciones descritas de sus diversos ortólogos. Al inicio de este trabajo, los estudios sobre las funciones de Cdc14 en mamíferos se reducían a estudios de los efectos de la sobreexpresión de sus ortólogos (Cdc14a y Cdc14b) o de la interferencia de su expresión mediante el uso de iRNA,

cuyos resultados no eran muy concluyentes (Mailand et al. 2002; Nalepa and Harper 2004). Dado que los modelos de ratón son una valiosa herramienta para estudiar y elucidar las bases genéticas de los procesos fisiológicos y patológicos, en este trabajo nos planteamos la generación de un modelo deficiente en Cdc14b con el cual elucidar las funciones de esta fosfatasa en la biología celular de mamíferos, así como su implicación en el desarrollo y en patologías como la tumorigénesis.

En ese primer momento, todo apuntaba a que el papel de Cdc14b en la salida de mitosis sería fundamental, sin embargo, nuestro estudio nos ha demostrado que no es así, y sorprendentemente, este modelo de ratón nos ha permitido encontrar otras funciones muy interesantes de esta fosfatasa.

1. ¿ Ha conservado Cdc14b sus funciones en la evolución?

Tal y como ha sido perfectamente descrito en *Saccharomyces cerevisiae* la desfosforilación de los sustratos de Cdk1 es esencial en la salida de mitosis (Visintin et al. 1998). Recientemente se ha demostrado que en las células de mamíferos también es indispensable (Manchado et al. 2010; Schmitz et al. 2010; Skoufias et al. 2007). A pesar de que en *Saccharomyces cerevisiae* la fosfatasa que regula este proceso es Cdc14 y de que sus ortólogos, Cdc14a y Cdc14b, son capaces de complementar su función en levaduras (Vazquez-Novelle et al. 2005), en mamíferos, se desconoce si las fosfatasas Cdc14 juegan un papel primordial en la división celular.

Nuestro modelo de ratón demuestra que Cdc14b es dispensable en la mitosis de las células de ratón. Este resultado concuerda perfectamente con el trabajo publicado por el Dr. Jallepalli en 2008, en el cual se utilizaron líneas humanas de cáncer colorrectal HCT116 deficientes en Cdc14b. Respecto a su ortólogo, Cdc14a, el estudio de su eliminación genética en células inmortales hTERT-RPE también ha demostrado que esta fosfatasa no es esencial en la mitosis. Por tanto, la dispensabilidad de Cdc14a o Cdc14b en este proceso es indiscutible. Sin embargo, si ambas fosfatasas son capaces de complementar las funciones de su ortólogo en levaduras, debemos considerar también una posible redundancia o complementariedad en sus funciones en organismos superiores. De ser así, en el caso de eliminar una de ellas, sería la otra la que desempeñaría su función. Dado que no existe ningún modelo genético en el que se eliminen ambos genes a la vez, no podemos afirmar que las fosfatasas Cdc14 no jueguen ningún papel en la salida de mitosis en células de mamíferos.

Por otro lado, estudios en huevos de *Xenopus* abogan porque la salida de mitosis está controlada por otras serín-treonín fosfatasas: PP1 y PP2A (Mochida et al. 2009; Vigneron et al. 2009; J. Q. Wu et al. 2009). Además, trabajos muy recientes en mamíferos, demuestran que la activación de PP2A es esencial en este proceso (Manchado et al. 2010; Schmitz et al. 2010). Parece plausible pues, que sean otras fosfatasas las que lleven a cabo la desfosforilación de sustratos de Cdk1 durante esta fase de la división celular, o por el contrario, que sea una acción conjunta de todas estas fosfatasas la que se encargue de ello. Así pues, para responder a la pregunta de si Cdc14a y Cdc14b han conservado alguna función en la regulación de la salida de mitosis en mamíferos, tendremos que esperar a la información que nos proporcione un modelo deficiente para ambas fosfatasas.

Por otro lado, en levaduras se ha descrito que Cdc14 regula el silenciamiento de la cromatina del rDNA durante la anafase mediante la desfosforilación de la RNA polimerasa (Clemente-Blanco et al. 2009). En este sentido, es interesante analizar en profundidad si en células de mamíferos existe alguna implicación de Cdc14b en la transcripción.

2. Implicación de Cdc14b en el ciclo celular.

La entrada en mitosis requiere la desactivación de las serín-treonín fosfatasas (Zhao et al. 2008). Además de la salida de mitosis y la citocinesis, en otros organismos como *Schizosaccharomyces pombe* y *Xenopus laevis*, se ha descrito que la fosfatasa Cdc14 interviene en la transición G2/M (Krasinska et al. 2007; Trautmann et al. 2001). Recientemente se ha descrito también que su homólogo Cdc14a previene la activación prematura de Cdk1 mediante la desfosforilación de Cdc25a y Cdc25b en la transición G2/M (Vazquez-Novelle et al. 2010). Por tanto, ¿podría ser Cdc14b otra fosfatasa que regula dicha transición? Cuando indujimos la entrada en el ciclo celular en los MEFs deficientes en Cdc14b parados en G0, comprobamos que alcanzan la mitosis en un periodo de tiempo mucho menor que los MEFs control. Esta aceleración en la entrada en mitosis podría venir dada por una transición G2/M prematura, similar a la descrita previamente para su homólogo Cdc14a. Así pues, para comprobar que dicha diferencia en el tiempo de entrada en mitosis venía dada por una transición G2/M prematura y no por alguna otra alteración en la progresión de las fases previas del ciclo celular, estudiamos la transición G1/S. Sorprendentemente, encontramos que la ausencia de Cdc14b desencadena una aceleración en la transición G1/S. Si bien por el momento no tenemos claras evidencias del mecanismo molecular

que genera dicha aceleración, resulta interesante analizar algunas hipótesis que podrían justificarlo y que en este momento estamos estudiando.

Por un lado, Cdc14b es una fosfatasa que en levaduras desfosforila sustratos de Cdk1, por lo que no sería extraño que en otras etapas del ciclo celular actuara desfosforilando sustratos de las Cdks interfásicas: Cdk2, Cdk4 y/o Cdk6. Cdk4 y Cdk6 controlan la entrada y progresión en G1 y Cdk2 la transición G1/S. Además, los inhibidores de la familia INK4 y Cip/Kip, regulan la actividad de estas quinasas, garantizando una adecuada progresión por el ciclo celular. Por tanto, Cdc14b podría intervenir en dicho control contrarrestando la actividad Cdks mediante la desfosforilación de alguno de sus sustratos como por ejemplo pRb. Experimentos preliminares indican unos mayores niveles de fosforilación de pRb en los MEFs deficientes en Cdc14b, por lo que estamos llevando a cabo estudios más precisos para poder elucidar si existe alguna relación entre Cdc14b y esta proteína.

Por otro lado, son notables las diferencias en los niveles de expresión de algunas proteínas entre los MEFs *Cdc14b*^{-/-} y *Cdc14b*^{+/+}, como por ejemplo los niveles totales de Cdk1 o incluso de algunas ciclinas (A, E, B). Si bien las diferencias en los niveles de ciclinas podrían explicarse por las diferencias en la progresión por el ciclo celular o por una deficiente activación del complejo APC-Cdh1, los niveles de Cdk1 permanecen constantes a lo largo de todo el ciclo. En *Saccharomyces cerevisiae*, en anafase, Cdc14 inhibe la transcripción de los genes ribosómicos mediante la inhibición por desfosforilación de una de las subunidades de la RNA polimerasa (Clemente-Blanco et al. 2009). Es posible que Cdc14b intervenga en la desfosforilación de la RNA polimerasa en otras etapas del ciclo celular. Por lo que las diferencias en los niveles de estas proteínas podrían explicarse bajo una desregulación de la actividad de dicha enzima.

Esta desregulación del ciclo celular podría explicar la mayor incidencia de tumores de larga latencia en los ratones deficientes en Cdc14b. Las alteraciones en la progresión en el ciclo celular están relacionadas con la tumorigénesis. De hecho, entre las proteínas que regulan el ciclo celular encontramos numerosos oncogenes y genes supresores de tumores (ciclinas, p21, pRb...) A pesar de que la ausencia de Cdc14b no tiene efectos muy drásticos en la progresión en el ciclo celular, probablemente esta pequeña desregulación a largo plazo pueda favorecer una ventaja proliferativa y la acumulación de anomalías genéticas que finalmente favorezcan la transformación maligna.

3. Cdc14b en la transformación oncogénica.

La sobreexpresión de Cdc14b en células NIH3T3 induce la transformación oncogénica, mediante la generación de cambios morfológicos y citoesqueléticos que desencadenan en un descontrol de la motilidad. Uno de los fenotipos más típicos de la transformación tumoral es el desbaratamiento de las fibras de actina (Bar-Sagi and Feramisco 1986; Pawlak and Helfman 2002; Ridley and Hall 1992; Rodriguez-Viciano et al. 1997; Zhong et al. 1997; Zondag et al. 2000), lo que favorece una disminución en la adhesión celular y por tanto el incremento en la motilidad y la capacidad de migrar. En este sentido, las células que sobreexpresan Cdc14b presentan anomalías en la formación de las fibras de estrés, en las adhesiones focales y en los niveles de N-Cadherina. Además, hemos constatado que estas células presentan gran similitud en cuanto a morfología y expresión génica con las células que sobreexpresan el oncogén H-Ras. No obstante, los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las células que sobreexpresan este oncogén siempre mostraron una mayor agresividad que las células que sobreexpresan Cdc14b (mayor número de focos, mayor número de colonias, mayor crecimiento tumoral...etc.).

El oncogén Ras, desencadena estas alteraciones morfológicas a través de dos rutas: la ruta de las quinasas MAPK (Pawlak and Helfman 2002; Zondag et al. 2000) y la de los efectores PI3K (Rodriguez-Viciano et al., 1997). Sorprendentemente, el fenotipo de transformación tumoral de las células que sobreexpresan Cdc14b es rescatado mediante la inhibición de la ruta de la quinasa MEK/ERK. Recientemente ha sido descrito que tanto Cdc14a como Cdc14b se unen y desfosforilan *in vitro* a la quinasa Erk3 en la salida de mitosis (Tanguay et al. 2010), por lo que nos planteamos si la sobreexpresión de Cdc14b podría estar alterando los niveles de fosforilación de sus homólogos Erk1, Erk2 o incluso MERK y por tanto, desencadenando todas estas anomalías. Sin embargo, el análisis bioquímico realizado no ha sido concluyente y en estos momentos estamos profundizando en esta hipótesis.

Hasta el momento no hemos podido esclarecer el mecanismo molecular por el que esta fosfatasa interviene en estas alteraciones citoesqueléticas que favorecen la transformación tumoral. No obstante, existen algunas referencias que apuntan a que esta fosfatasa puede tener alguna función en la regulación del citoesqueleto celular. En mamíferos se ha descrito que Cdc14 es capaz de estabilizar los microtúbulos *in vitro*, los cuales son resistentes a la despolimerización dado su enriquecimiento en tubulina-acetilada (Cho et al. 2005). Por otro lado, se ha relacionado a esta fosfatasa con la deacetilasa de tubulina SIRT2 (North and Verdin 2007). Sin embargo, hemos

comprobado los niveles de tubulina acetilada en estas células y no se han observado diferencias significativas en este sentido.

Los análisis de expresión génica de las células que sobreexpresan Cdc14b revelan ciertas similitudes con los perfiles que presentan las células que sobreexpresan H-Ras. Por otro lado, Cdc14b es una proteína que en interfase se localiza en el núcleo. Nada sabemos de las funciones de esta fosfatasa en esta etapa del ciclo celular. Tampoco tenemos constancia de que Cdc14b se localice fuera del núcleo durante la interfase. Entonces, ¿cómo puede una fosfatasa nuclear originar tales cambios en el citoesqueleto? Como ya he comentado, en *Saccharomyces cerevisiae*, en anafase Cdc14 inhibe la transcripción de los genes ribosómicos mediante la inhibición por desfosforilación de una de las subunidades de la RNA polimerasa (Clemente-Blanco et al. 2009). Basándonos en este hecho, otra hipótesis interesante podría ser que Cdc14b interviniese en la regulación transcripcional de determinados genes mediante la desfosforilación de la RNA polimerasa. De ser así, ¿podrían las transformaciones citoesqueléticas observadas en estas células ser un efecto indirecto de alteraciones en la transcripción?

4. Cdc14b en la espermatogénesis.

Los ratones machos deficientes en Cdc14b son estériles. Dada la importancia de las interacciones entre las células somáticas y las espermatógenas, no se ha podido estudiar la espermatogénesis *in vitro*, sin embargo, los modelos de ratón representan una interesante alternativa. La identificación de genes que desencadenan alteraciones en este proceso no solo nos permite relacionar la patología de la infertilidad con sus causas genéticas sino que además, nos ayuda a comprender los mecanismos moleculares que regulan este proceso. Así, en este estudio no solo hemos identificado a Cdc14b como un gen relacionado con la infertilidad, sino que además, nos ha permitido encontrar dos nuevas funciones de dicha fosfatasa, la primera en la regulación del paquiteno y la segunda en la maduración de las espermátidas.

4.1. Causas y consecuencias de la presencia de los cromosomas X e Y univalentes.

Los quiasmas integran las conexiones físicas necesarias para mantener los cromosomas homólogos unidos en la estructura bivalente hasta el momento de la segregación en la anafase I.

La presencia de cromosomas univalentes en las metafases I se debe a diversos defectos en la recombinación homóloga como asinapsis, problemas en la formación de los nódulos de recombinación, defectos en proceso de entrecruzamiento, en formación de los quiasmas y desinapsis precoz. Por un lado, los modelos de ratón en los que la ausencia de una proteína desencadena asinapsis generalizada y como consecuencia defectos en la formación de los entrecruzamientos (Burgoyne et al. 2009), generalmente sufren una parada en paquitenio y apoptosis celular (S. S. de Vries et al. 1999; F. A. de Vries et al. 2005; Yoshida et al. 1998). Respecto a las proteínas que intervienen directamente en la recombinación homóloga, cabe destacar que mientras los modelos deficientes en Msh4 y Msh5 sufren apoptosis en zigoteno/paquitenio (Edelmann et al. 1999; Kneitz et al. 2000), en ausencia de Mlh1 o Mlh3 los problemas en la formación de los quiasmas hacen que aunque la mayoría de los espermatocitos sean eliminados en paquitenio, algunos de ellos progresen y alcancen la metafase I con un elevado porcentaje de cromosomas univalentes (Baker et al. 1996; Edelmann et al. 1996; Lipkin et al. 2002). Por otro lado, los problemas de desinapsis se relacionan con un apareamiento y sinapsis adecuado de los cromosomas homólogos, pero con un desmontaje del complejo sinaptonémico prematuro. Lo que origina que la separación de los cromosomas homólogos tenga lugar antes de que los quiasmas se hayan formado (Bartke and Krzanowska 1972).

Sorprendentemente, el modelo de ratón deficiente en Cdc14b presenta univalentes solamente en la pareja de los cromosomas sexuales. En la espermatogénesis, debido a el carácter heterólogo de esta pareja de cromosomas debemos considerar dos hechos importantes. El primero, los cromosomas X e Y presentan cierta asincronía con respecto a los autosomas pues al compartir solamente una pequeña porción homóloga por la que aparear (PAR) tardan más en reconocerse; mientras que al inicio del paquitenio los autosomas están perfectamente sinaptados en toda su longitud, la sinapsis de los cromosomas sexuales tiene lugar en paquitenio temprano. El segundo hecho a considerar es que el resto de cromatina no sinaptada debe silenciarse para evitar que sea reconocida por el *checkpoint* (MSIC) (Odorisio et al. 1998). Por tanto, la ausencia de MSIC activa el punto de control del paquitenio. *In vivo*, la transición por paquitenio se prolonga hasta 6 días. De manera similar a lo que ocurre en la transición G2/Mitosis, experimentos *in vitro* con ácido okadaico (inhibidor de serín-treonín fosfatasa), demuestran que esta droga induce la salida de paquitenio y progresión hasta metafase I en pocas horas. Parece ser que la droga favorece que se active la actividad quinasa del MPF y los espermatocitos condensan el DNA y se desmonta el complejo sinaptonémico (Handel et al. 1995). Resulta interesante que en estas circunstancias, mientras los autosomas aparecen siempre como estructuras bivalentes unidos por los quiasmas;

los cromosomas sexuales no, además de bivalentes, se encuentran también en otros distintos grados de condensación, incluso en forma de cuerpo sexual. Esta variabilidad en el comportamiento de los cromosomas sexuales podría explicarse por la asincronía de estos cromosomas con respecto de los autosomas (Wiltshire et al. 1995). Por todo ello, la presencia de cromosomas sexuales univalentes en metafase I en el modelo de ratón deficiente en Cdc14b podría deberse a dos hechos, o bien un problema en el proceso de entrecruzamiento que afecte exclusivamente a la pareja de cromosomas sexuales, o bien una desinapsis prematura de estos cromosomas. El hecho de que el porcentaje de cromosomas univalentes incrementa a medida que se progresa por paquitenio temprano, tardío y diploteno, nos lleva a pensar en un problema de desinapsis prematura.

De los experimentos *in vitro* con el ácido okadaico podemos concluir que la inhibición de las serín-treonín fosfatasa acelera la entrada en la primera división meiótica. Considerando que al final del paquitenio comienza la activación del MPF y que es éste quién, al igual que en la entrada en mitosis, regula la transición G2/Meiosis (Wolgemuth et al. 2002), cualquier desregulación en el balance quinasa/fosfatasa, podría favorecer una desinapsis y una entrada en la primera división meiótica precoz. Por tanto, ¿está Cdc14b directamente implicado en el balance de actividad quinasa fosfatasa en la transición G2/Meiosis? Los espermatoцитos deficientes en ciclina A1 presentan una parada a nivel del diploteno, ya que el MPF no es activado eficientemente (Liu et al. 1998). Sin embargo, la desregulación del balance quinasa/fosfatasa utilizando ácido okadaico, favorece la condensación de los cromosomas de estos espermatoцитos, el desensamblaje del CS y la progresión en la meiosis (Liu et al. 2000). El hecho de que la ausencia de Cdc14b en los espermatoцитos deficientes en ciclina A1 no favorezca una progresión en la meiosis y los espermatoцитos mantengan la parada en diploteno, demuestra que la deficiencia en Cdc14b no está afectando al balance de actividad quinasa/fosfatasa en la transición G2/Meiosis.

Recientemente, Cdc14b ha sido implicada en la ruta que regula el punto de control del daño al DNA en G2 (Bassermann et al. 2008). El hecho de que la recombinación homóloga se inicie con rupturas de doble cadena en el DNA y de que las rutas de reparación del daño (*DNA damage repair*, DDR) estén activas a lo largo de este proceso, nos hace pensar en una posible similitud entre el punto de control del daño al DNA en G2 y el *checkpoint* de paquitenio (Burgoyne et al. 2007). De ser así, ¿es Cdc14b una fosfatasa que regula el punto de control de paquitenio? Se respondió a esta hipótesis con el modelo de ratón deficiente en Cdk2 y Cdc14b. En levaduras, las proteínas de la ruta DDR, Rad24, Rad17, Ddc1 y Mec1, están integradas también en la ruta del punto de control del paquitenio (Lydall et al. 1996). En estos organismos, si se combina una

mutación que genera parada en paquitenio con una mutación en alguna de estas proteínas (como por ejemplo *dmc1* y *Rad24*) los mutantes se saltan dicha parada y entran en la primera división meiótica acumulando defectos fruto de los problemas en la recombinación homóloga. De manera similar, mientras los espermatoцитos deficientes en *Cdk2* se paran en paquitenio por la no reparación de las rupturas del DNA, problemas en el anclaje de algunos telómeros a la envuelta nuclear, problemas en el apareamiento, sinapsis incompleta y ausencia de cuerpo sexual (Ortega et al. 2003; Viera et al. 2009), los espermatoцитos deficientes en *Cdk2* y además deficientes en *Cdc14b*, no se paran en paquitenio y progresan hacia meiosis I. Este resultado apoya la idea de que *Cdc14b* es una fosfatasa implicada en el punto de control de paquitenio. De acuerdo con esto, la deficiencia en *Cdc14b* conllevaría a un control defectuoso de la parada de paquitenio y por tanto al desensamblaje prematuro del CS. Esto generaría fenómenos de desinapsis precoz que explicaría la presencia de los cromosomas sexuales univalentes en un elevado porcentaje de las metafases I de los espermatoцитos deficientes en *Cdc14b*. Dado el carácter heterólogo de los cromosomas sexuales, los cuales parecen ser los que necesitan más tiempo para sinaptar e iniciar el entrecruzamiento de cromatina, serían éstos los más sensibles al acortamiento del paquitenio.

4.2. *Cdc14b* y el punto de control de paquitenio.

Los problemas en la recombinación homóloga y en la formación de los quiasmas podrían desencadenar aneuploidías u otras alteraciones genéticas en los gametos. Considerando que la meiosis es el inicio de la reproducción sexual, esto desencadenaría efectos catastróficos en los organismos descendientes como por ejemplo letalidad embrionaria o malformaciones. El punto de control del paquitenio asegura que el proceso de recombinación homóloga sea preciso. Considerando que los problemas de infertilidad afectan aproximadamente al 10-15% de las parejas, el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan este punto de control es fundamental para avanzar en la identificación de las alteraciones genéticas relacionadas con la infertilidad, en la mejora de las futuras tecnologías de la reproducción asistida (curación de mutaciones y generación de células germinales *in vitro*) y en el análisis de los factores de riesgo para la generación de gametos aneuploides (Matzuk and Lamb 2008). De hecho, deficiencias en los fenómenos de recombinación han sido directamente relacionados con síndromes trisómicos como el síndrome de Down, de Edward y de Patau (Hassold and Hunt 2001), con la azospermia no obstructiva (Gonsalves et al. 2004; Sun et al. 2008b) y con la infertilidad masculina producida por aneuploidía gamética (Sun et al. 2008a). Hasta ahora, el mecanismo molecular que regula el punto de control

de paquitenos es poco conocido, por lo que la identificación de Cdc14b como una molécula esencial en este proceso aporta luz a este campo. Sin embargo muchas cuestiones quedan abiertas.

Durante las primeras fases de la meiosis, leptoteno y zigoteno, toda la maquinaria enzimática se prepara para llevar a cabo los entrecruzamientos de cromatina. En el paquitenos, este proceso culmina con la formación de los quiasmas. A partir de este momento, se inicia la reversión; el desensamblaje de todas las estructuras y la transición hacia la primera división meiótica. El punto de control del paquitenos actúa a modo de interruptor bioquímico, vigilando la recombinación homóloga y regulando que únicamente cuando todos los cromosomas han formado los quiasmas, se inicie el proceso de reversión de cambios, el ciclo se reanude y la célula entre en la primera división meiótica.

Como todo punto de control, este *checkpoint* opera bajo el siguiente proceso: en primer lugar debe existir una señal que sea detectada por unos sensores, los cuales a su vez activen una ruta de transducción cuyo efecto final sea el control de la parada o progresión paquitenos/diploteno. Gracias a los modelos de ratón hemos podido identificar muchos de los requerimientos moleculares necesarios para que la recombinación homóloga transcurra adecuadamente. Tenemos mucha información sobre las señales que activan este punto de control promoviendo que un espermatocito sufra una parada en paquitenos y entre en apoptosis. Sin embargo, poco se sabe sobre los sensores o las rutas de transducción que controlan la parada o la progresión en la meiosis. Mientras en levaduras las proteínas de DDR Rad24, Rad17, Ddc1 y Mec1, están integradas en estas rutas (Lydall et al. 1996), en mamíferos a pesar de que sus homólogos están implicados en el proceso de recombinación homóloga, no parece que éstos operen en la ruta del punto de control del paquitenos. Así, sorprendentemente, el modelo de ratón deficiente en Atm (homólogo de Mec1) sufre parada en paquitenos y apoptosis debido a los problemas en la reparación de los DSB, asinapsis y fallo en MSCI (Y. Xu et al. 1996). Esto nos indica que, o bien esta quinasa no forma parte de la ruta de transducción del punto de control de paquitenos, o bien existen otras enzimas que actúan redundantemente, como por ejemplo Atr. Considerando que la recombinación homóloga se inicia con DSB y la activación de Atm, es bastante probable que la ruta de DDR esté implicada directa o indirectamente en la parada del ciclo celular. El hecho de que la heterocigosidad de Spo11 rescate la parada de paquitenos de los espermatocitos deficientes en Atm es sorprendente (Bellani et al. 2005). Sin embargo, se podría explicar por una doble función de Atm, por un lado en las rutas de DDR y recombinación homóloga y por otro lado interviniendo en el *checkpoint*. En este modelo, las consecuencias de la ausencia de Atm en la reparación de los DSB podrían suponer una señal tan fuerte del *checkpoint* que éste se activara por alguna segunda ruta

como por ejemplo la mediada por Atr. En contraposición, en condiciones de heterocigosidad de Spo11 el número de DSB generados en el DNA se reduciría significativamente, de manera que la ausencia de Atm podría no ser suficiente para activar la otra ruta (Atr?) manifestándose el defecto en la parada de paquitenio, que llevaría a los espermatoцитos a progresar hasta metafase I. Es probable que otras proteínas de la ruta DDR estén implicadas en la regulación de la parada en paquitenio, sin embargo, se desconocen por el momento.

Dado que la ruta de transducción del punto de control del paquitenio en mamíferos es completamente desconocida, resulta muy complicado estudiar cómo interviene Cdc14b en esta ruta. Siguiendo con la analogía entre el punto de control de daño al DNA y el punto de control de paquitenio, nos preguntamos si Cdc14b podría estar integrado en meiosis en una ruta similar a la que describe el Dr. Pagano para el checkpoint de daño al DNA en G2/M (Bassermann et al. 2008). En este modelo, tras la inducción del daño, Cdc14 desfosforila Cdh1. La activación de APC-Cdh1 conlleva a la degradación de Plk1 y como consecuencia a la desfosforilación de claspin. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna evidencia que sugiera que en meiosis, sea ésta la ruta en la que Cdc14b se vea implicada.

Otra proteína que en levadura se ha relacionado con el punto de control de paquitenio es la ATPasa Pch2. Ésta se localiza en el nucleolo junto con la deacetilasa Sir2 y en focos dispersos en a lo largo de los cromosomas meióticos (San-Segundo and Roeder 1999). En estos organismos, las mutaciones en Pch2 y Sir2 rescatan la parada en paquitenio de mutantes como dmc1 mediante un mecanismo desconocido. En *Caenorhabditis elegans*, también se ha descrito que Pch2 controla la parada en paquitenio en situaciones de asinapsis (Bhalla and Dernburg 2005). Sin embargo, en mamíferos, su ortólogo TRIP13 a pesar de ser una proteína fundamental en la formación de los entrecruzamientos de la cromatina, no conserva su función en el punto de control del paquitenio (Roig et al. 2010). Elucubrando, dado que Cdc14b es una proteína nucleolar, que uno de los ortólogos de Sir2 en mamífero (SIRT2) es su sustrato (North and Verdin 2007) y que previamente se ha relacionado a Cdc14b con el silenciamiento y la segregación del rDNA (Clemente-Blanco et al. 2009; Machin et al. 2006) sería muy interesante estudiar si existe alguna relación entre todos estos factores y el punto de control de paquitenio.

Por otro lado, debemos considerar que el punto de control del paquitenio responde a diversas señales como persistencia de DSB, asinapsis, fallo en el MSCI, problemas en los entrecruzamientos... En levaduras, la ruta que controla la persistencia de DSB y la ruta que controla la sinapsis son distintas pero convergen en los efectores finales (Hochwagen and Amon

2006; Roig et al. 2010). Hasta el momento no tenemos datos que nos permitan discernir si en mamíferos la ruta de transducción que opera ante estas señales es solo una. Sin embargo, lo más probable es que se trate de varias rutas iniciales que converjan en un punto final (Barchi et al. 2005). En este sentido, la deficiencia de Cdk2 genera defectos variados en el proceso de recombinación homóloga como persistencia de DSB, la asinapsis, fragmentación de cromosomas y fallo en el MSCI. El hecho de que la ausencia de Cdc14b prevenga la parada en paquiteno ante todos estos defectos, sitúa a esta fosfatasa en la convergencia de varias de estas rutas. Teniendo todo esto en cuenta, resultaría interesante el análisis de la deficiencia de Cdc14b en otros modelos en los que la parada en paquiteno venga dada por otras señales.

Por último, ¿quién está por debajo de Cdc14b en la ruta de transducción del punto de control de paquiteno? De momento carecemos de datos suficientes con los que responder a esta pregunta. Sin embargo, si seguimos el modelo de levaduras, en la parada de paquiteno, los efectores finales son Swe1 y los factores de transcripción de las ciclinas B; Ntd80 y Sum1 (Roeder and Bailis 2000). El factor de transcripción Ntd80 al final del paquiteno es activado por fosforilación (Tung et al. 2000). Resulta interesante que en estos últimos pasos de la ruta, el mecanismo molecular que controla la activación o la desactivación de estas proteínas sea la fosforilación-desfosforilación. En mamíferos, se ha descrito que al final del paquiteno comienza la retranscripción de ciclina B (Nguyen et al. 2002). De acuerdo a los experimentos del ácido okadaico, parece ser que al igual que en la transición G2/Mitosis, la activación progresiva del MPF induce la progresión por diploteno, diaquinesis y entrada en la primera división meiótica. Por tanto, la ruta de parada en paquiteno, probablemente tenga como diana final la inhibición de la activación del MPF. Esto nos hace elucubrar distintos mecanismos mediante los cuales Cdc14b podría actuar en esta regulación, como por ejemplo la promoción de la degradación de ciclinas por activación del complejo APC-Cdh1, la desfosforilación e inactivación de alguna proteína esencial en la activación del MPF o la activación por desfosforilación de algún inhibidor del MPF, lo cual no resulta extraño si consideramos que en salida de mitosis de levaduras Cdc14 activa por desfosforilación a Sic1 (Visintin et al. 1998).

4.3. Dimorfismo sexual en la fertilidad de los ratones deficientes en Cdc14b.

En la meiosis, existe un significativo dimorfismo sexual en la progresión por las últimas etapas de este proceso. Mientras en la espermatogénesis la transición de paquiteno-diploteno es directa, en la ovogénesis el proceso es más complejo. En este caso la recombinación homóloga comienza en el desarrollo fetal; los ovocitos progresan hasta paquiteno y forman los

entrecruzamientos. Al nacer el proceso es interrumpido durante semanas (ratones) o años (humanos), manteniéndose estos ovocitos en un estado de reposo denominado dictioteno. Con la ovulación, las señales hormonales inducen la reanudación del ciclo, permitiendo el desensamblaje del CS y la progresión hasta metafase II. No obstante, el punto de control de paquiteno también opera en este caso vigilando la asinapsis y los fenómenos de entrecruzamiento; sin embargo, la progresión de paquiteno a diploteno además está controlada por señales hormonales y somáticas (Handel and Schimenti 2010). Curiosamente, mientras en algunos modelos de ratón la ausencia de una determinada proteína origina defectos similares en ambos sexos (Atm, Dmc1, Mlh1, Mlh3, Msh4, Msh5...), en otros modelos existen dimorfismos (Spo11, H2AX, Brca1, Cdc25b, Ciclina A1...). De hecho, tanto el punto de control de paquiteno como el SAC actúan de manera más eficiente en la espermatogénesis que en la ovogénesis (Hunt and Hassold 2002).

El modelo de ratón deficiente en *Cdc14b* constituye otro ejemplo de dimorfismo: los machos son estériles mientras que las hembras no lo son. Para analizar las causas de dicho dimorfismo, en primer lugar debemos considerar que la esterilidad de estos machos es consecuencia de la suma de dos factores: por un lado un defecto en el punto de control del paquiteno, y por otro, una aberración morfológica en la maduración de las espermatidas. Dado que las hembras sólo pueden estar afectadas por el primero de los factores, ésta podría ser una explicación. Sin embargo, ¿juega algún papel *Cdc14b* en el paquiteno de la ovogénesis? El análisis de hembras deficientes en *Cdk2* y *Cdc14b* podría ser muy informativo en este sentido. Por otro lado, el trabajo de Schindler y colegas sobre la sobreexpresión de *Cdc14b* en ovocitos de ratón indica que al menos esta fosfatasa está implicada en el mantenimiento del dictioteno (Schindler and Schultz 2009). En este estudio, la sobreexpresión de *Cdc14b* tras la estimulación de los ovocitos, conlleva a la degradación de ciclina B por medio de la activación permanente del complejo APC-Cdh1 y retrasa la entrada en meiosis I. Análogamente, la deficiencia en *Cdc14b* podría desencadenar una transición G2/Meiosis más rápida en estos ovocitos que podría generar defectos en la producción de gametos. En hembras, este tipo de defectos se manifiesta como subfertilidad o simplemente reducción de la longitud de la vida fértil (Lyon and Hawker 1973). Entre los 3-12 meses de edad, las hembras deficientes en *Cdc14b* son igual de fértiles que las de genotipo silvestre y producen camadas de tamaño similar. No tenemos datos de si existe un acortamiento de duración de la vida fértil posterior a esta fecha. No obstante, los estudios patológicos de las hembras sacrificadas a las 100 semanas de edad tampoco mostraron diferencias entre las hembras de genotipo *Cdc14b*^{+/+} y las de genotipo *Cdc14b*^{-/-}. Por lo que en este sentido, no tenemos ningún indicio de que la ausencia de *Cdc14b* tenga algún efecto en la producción de gametos femeninos.

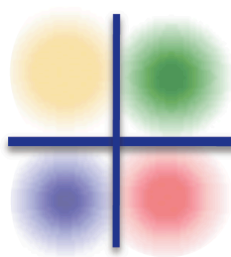
4.4. ¿Es Cdc14b esencial en la espermiogénesis?

Durante los últimos años los modelos de ratón han permitido identificar muchas de las causas genéticas que desencadenan infertilidad en los hombres. Además de la oligospermia (baja concentración de espermatozoides en el semen) frecuentemente encontramos otros defectos como teratozoospermia (defectos en la morfología de los espermatozoides), asthenospermia (defectos en la motilidad) e incluso una combinación de todos ellos (oligoasthenoteratozoospermia) (Cooke and Saunders 2002; Yan 2009). Si bien la producción de espermatozoides se ve comprometida debido a la presencia frecuente de cromosomas sexuales univalentes, además los espermatozoides deficientes en Cdc14b presentan importantes defectos en la maduración de las espermatidas que dan lugar a alteraciones en la morfología de las cabezas de los espermatozoides y problemas de motilidad (oligoasthenoteratozoospermia).

Frecuentemente la disminución de la motilidad se relaciona con problemas en el desarrollo de la cola del espermatozoide. En el axonema que lo constituye es frecuente encontrar la tubulina acetilada. Siendo la deacetilasa de tubulina Sirt2 un sustrato de Cdc14b (North and Verdin 2007) pensamos que la ausencia de esta fosfatasa podría conllevar a alteraciones en la tubulina acetilada, sin embargo, no hemos encontrado ningún indicio de ello. En las ciliopatías la estructura del axonema se ve comprometida. No obstante, hemos comprobado que la ausencia de Cdc14b no altera ni la formación del axonema ni de las estructuras adyacentes. Sorprendentemente, con la ayuda del Dr. Kierzesbaum encontramos una contracción anormal a nivel del anillo del acroplaxoma que estrangula el núcleo por encima del anillo perinuclear de la manchette. Además, el anillo marginal del acroplaxoma en el mutante de Cdc14b es anormal y carece de filamentos intermedios de queratina 5 o el número de filamentos está muy reducido. Considerando que el complejo acroplaxoma- acrosoma-manchette (AAM) juega un papel fundamental en la evolución de la forma de la cabeza durante la maduración de las espermatides (Kierszenbaum et Tres, 2004), probablemente Cdc14b intervenga en este proceso. Además, las espermatidas maduras de la luz del tubo seminífero muestran una separación a nivel del aparato acoplador cabeza-cola (*head-tail coupling apparatus*; HTCA) que desencadena una dislocación de la cabeza del espermatozoide y la tendencia de la cola a rodear la cabeza en forma de ovillo. El mecanismo molecular en el que interviene esta fosfatasa es desconocido. Además de sus funciones en el ciclo celular, previamente, en levaduras, esta fosfatasa ha sido relacionada con la estabilización de microtúbulos durante la anafase y con la estabilización del cuerpo medio en la telofase (Higuchi and Uhlmann 2005). En mamíferos también se ha descrito que Cdc14 es capaz de estabilizar los microtúbulos *in vitro*, los cuales son resistentes a la despolimerización dado su enriquecimiento en tubulina

acetilada (Cho et al. 2005). Por último, es interesante considerar que Cdk1, Cdk2 y Cdk4 se encuentran altamente expresadas en las espermátidas, lo que ha sugerido que estas quinasas estén desempeñando alguna función en la espermiogénesis (Rhee and Wolgemuth 1995). Sorprendentemente Cdk1 se localiza en el cuerpo basal de las espermátidas (comunicación personal de la doctora Marta Cañamero), lo que indica que probablemente los mecanismos de fosforilación-desfosforilación regulan algunos de los cambios morfológicos que contribuyen a la formación del flagelo.

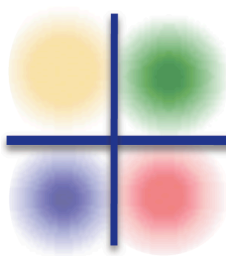
En conclusión, la fosfatasa Cdc14b es dispensable en la salida de mitosis, sin embargo, interviene en la correcta progresión por el ciclo celular. Su ausencia no desencadena desregulaciones muy drásticas en dicho ciclo, sin embargo, la falta prolongada en el tiempo de Cdc14b origina alteraciones que pueden favorecer la transformación tumoral y el cáncer. Por otro lado, hemos constatado que Cdc14b es esencial en la espermatogénesis. Así, hemos identificado dos nuevas funciones de esta fosfatasa. La primera, en el punto de control del paquiteno, el cual es esencial para que el proceso de recombinación homóloga transcurra adecuadamente y la segunda en la maduración de las espermátidas. Por tanto, las mutaciones del gen de *Cdc14b* pueden originar esterilidad en los machos, pero además, dada su importancia en el *checkpoint* de paquiteno, Cdc14b es esencial para evitar que las anomalías en la recombinación homóloga progresen en la meiosis dando lugar a gametos aneuploides.



Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Cdc14b es dispensable en el desarrollo embrionario de mamíferos. Los ratones deficientes en Cdc14b nacen sin ninguna patología o defecto fisiológico fruto de la ausencia de este gen.
2. Los ratones deficientes en Cdc14b presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo tumoral, tanto espontáneo como inducido por carcinógenos químicos, presumiblemente debido a la desregulación en el ciclo celular o de sus *checkpoints*.
3. La fosfatasa Cdc14b es dispensable en la progresión y salida de mitosis. No obstante, debido a una posible redundancia funcional entre ésta y su homólogo Cdc14a no podemos aseverar que Cdc14b no tenga ninguna función en dicho proceso.
4. Los MEFs deficientes en Cdc14b presentan una transición G1/S y una transición G2/M prematuras cuando son liberados de su parada en G0, lo que nos indica que esta fosfatasa puede intervenir en el control de la progresión del ciclo celular.
5. La sobreexpresión de Cdc14b en células de mamíferos conduce a cambios citoesqueléticos que favorecen una transformación oncogénica similar a la inducida por el oncogen Ras.
6. Los machos deficientes en Cdc14b son estériles. La espermatogénesis de estos animales se ve comprometida a nivel de la meiosis y de la espermiogénesis, lo que genera fenómenos de oligoteratoastenozoospermia.
7. Cdc14b es una fosfatasa fundamental en la ruta del punto de control del paquiteno.
8. La fosfatasa Cdc14b interviene en el proceso de maduración de las espermátidas, en el desarrollo del acrosoma y en el acoplamiento de la cabeza y de la cola del espermatozoide.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. R., et al. (2001), 'Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells', *Chromosoma*, 110 (2), 65-74.
- Albertson, D. G., et al. (2003), 'Chromosome aberrations in solid tumors', *Nat Genet*, 34 (4), 369-76.
- Allers, T. and Lichten, M. (2001), 'Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis', *Cell*, 106 (1), 47-57.
- Alonso, A., et al. (2004), 'Protein tyrosine phosphatases in the human genome', *Cell*, 117 (6), 699-711.
- Baker, S. M., et al. (1996), 'Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over', *Nat Genet*, 13 (3), 336-42.
- Balmain, A. and Pragnell, I. B. (1983), 'Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene', *Nature*, 303 (5912), 72-4.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J. R. (1986), 'Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins', *Science*, 233 (4768), 1061-8.
- Barchi, M., et al. (2008), 'ATM promotes the obligate XY crossover and both crossover control and chromosome axis integrity on autosomes', *PLoS Genet*, 4 (5), e1000076.
- Barchi, M., et al. (2005), 'Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage', *Mol Cell Biol*, 25 (16), 7203-15.
- Bardin, A. J., Visintin, R., and Amon, A. (2000), 'A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus', *Cell*, 102 (1), 21-31.
- Barr, A. R. and Gergely, F. (2007), 'Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles', *J Cell Sci*, 120 (Pt 17), 2987-96.
- Bartke, A. and Krzanowska, H. (1972), 'Spermatogenesis in mouse strains with high and low abnormal spermatozoa', *J Hered*, 63 (4), 172-4.
- Bassermann, F., et al. (2008), 'The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint', *Cell*, 134 (2), 256-67.
- Bellani, M. A., et al. (2005), 'SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of Atm^{-/-} spermatocytes', *J Cell Sci*, 118 (Pt 15), 3233-45.
- Berdougo, E., et al. (2008), 'The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells', *Cell Cycle*, 7 (9), 1184-90.

- Bhalla, N. and Dernburg, A. F. (2005), 'A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 310 (5754), 1683-6.
- Blangy, A., et al. (1995), 'Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo', *Cell*, 83 (7), 1159-69.
- Bolcun-Filas, E., et al. (2007), 'SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination', *J Cell Biol*, 176 (6), 741-7.
- Bolcun-Filas, E., et al. (2009), 'Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair', *PLoS Genet*, 5 (2), e1000393.
- Bollen, M., Gerlich, D. W., and Lesage, B. (2009), 'Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides', *Trends Cell Biol*, 19 (10), 531-41.
- Booher, R. N., Holman, P. S., and Fattaey, A. (1997), 'Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity', *J Biol Chem*, 272 (35), 22300-6.
- Brennan, I. M., et al. (2007), 'Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis', *PLoS One*, 2 (5), e409.
- Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., and Turner, J. M. (2007), 'The management of DNA double-strand breaks in mitotic G2, and in mammalian meiosis viewed from a mitotic G2 perspective', *Bioessays*, 29 (10), 974-86.
- Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., and Turner, J. M. (2009), 'The consequences of asynapsis for mammalian meiosis', *Nat Rev Genet*, 10 (3), 207-16.
- Carmena, M. and Earnshaw, W. C. (2003), 'The cellular geography of aurora kinases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (11), 842-54.
- Celeste, A., et al. (2002), 'Genomic instability in mice lacking histone H2AX', *Science*, 296 (5569), 922-7.
- Cho, H. P., et al. (2005), 'The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules', *Mol Cell Biol*, 25 (11), 4541-51.
- Clemente-Blanco, A., et al. (2009), 'Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase', *Nature*, 458 (7235), 219-22.
- Cooke, H. J. and Saunders, P. T. (2002), 'Mouse models of male infertility', *Nat Rev Genet*, 3 (10), 790-801.
- Cotroneo, M. S., et al. (2007), 'Characterizing a rat Brca2 knockout model', *Oncogene*, 26 (11), 1626-35.
- Cowley, D. O., et al. (2009), 'Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development', *Mol Cell Biol*, 29 (4), 1059-71.
- Cueille, N., et al. (2001), 'Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis', *J Cell Sci*, 114 (Pt 14), 2649-64.
- D'Amours, D. and Amon, A. (2004), 'At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network', *Genes Dev*, 18 (21), 2581-95.
- D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004), 'Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA', *Cell*, 117 (4), 455-69.
- de Vries, F. A., et al. (2005), 'Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation', *Genes Dev*, 19 (11), 1376-89.

- de Vries, S. S., et al. (1999), 'Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis', *Genes Dev*, 13 (5), 523-31.
- De Wulf, P., Montani, F., and Visintin, R. (2009), 'Protein phosphatases take the mitotic stage', *Curr Opin Cell Biol*, 21 (6), 806-15.
- Edelmann, W., et al. (1999), 'Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis', *Nat Genet*, 21 (1), 123-7.
- Edelmann, W., et al. (1996), 'Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice', *Cell*, 85 (7), 1125-34.
- Elhajouji, A., Cunha, M., and Kirsch-Volders, M. (1998), 'Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay', *Mutagenesis*, 13 (2), 193-8.
- Evans, T., et al. (1983), 'Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33 (2), 389-96.
- Faragher, A. J. and Fry, A. M. (2003), 'Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles', *Mol Biol Cell*, 14 (7), 2876-89.
- Fernandez-Capetillo, O., et al. (2003), 'H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis', *Dev Cell*, 4 (4), 497-508.
- Fung, T. K. and Poon, R. Y. (2005), 'A roller coaster ride with the mitotic cyclins', *Semin Cell Dev Biol*, 16 (3), 335-42.
- Gautier, J., et al. (1988), 'Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*', *Cell*, 54 (3), 433-9.
- Gautier, J., et al. (1990), 'Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*', *Cell*, 60 (3), 487-94.
- Geijsen, N., et al. (2004), 'Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells', *Nature*, 427 (6970), 148-54.
- Gonsalves, J., et al. (2004), 'Defective recombination in infertile men', *Hum Mol Genet*, 13 (22), 2875-83.
- Goto, H., et al. (2002), 'Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation', *Genes Cells*, 7 (1), 11-7.
- Gray, C. H. and Barford, D. (2003), 'Getting in the ring: proline-directed substrate specificity in the cell cycle proteins Cdc14 and CDK2-cyclinA3', *Cell Cycle*, 2 (6), 500-2.
- Gruneberg, U., et al. (2002), 'The CeCDC-14 phosphatase is required for cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo', *J Cell Biol*, 158 (5), 901-14.
- Guillon, H., et al. (2005), 'Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis', *Mol Cell*, 20 (4), 563-73.
- Handel, M. A. and Schimenti, J. C. (2010), 'Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility', *Nat Rev Genet*, 11 (2), 124-36.
- Handel, M. A., Caldwell, K. A., and Wiltshire, T. (1995), 'Culture of pachytene spermatocytes for analysis of meiosis', *Dev Genet*, 16 (2), 128-39.
- Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. (1989), 'Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events', *Science*, 246 (4930), 629-34.
- Hartwell, L. H., et al. (1973), 'Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants', *Genetics*, 74 (2), 267-86.

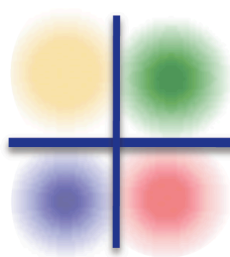
- Hassold, T. and Hunt, P. (2001), 'To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy', *Nat Rev Genet*, 2 (4), 280-91.
- Higuchi, T. and Uhlmann, F. (2005), 'Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation', *Nature*, 433 (7022), 171-6.
- Hochwagen, A. and Amon, A. (2006), 'Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination', *Curr Biol*, 16 (6), R217-28.
- Hoffmann, I., et al. (1993), 'Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis', *EMBO J*, 12 (1), 53-63.
- Homer, H. A., et al. (2005), 'Restaging the spindle assembly checkpoint in female mammalian meiosis I', *Cell Cycle*, 4 (5), 650-3.
- Hunt, P. A. and Hassold, T. J. (2002), 'Sex matters in meiosis', *Science*, 296 (5576), 2181-3.
- Iwabuchi, M., et al. (2000), 'Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts', *EMBO J*, 19 (17), 4513-23.
- Jacobsen, K., Groth, A., and Willumsen, B. M. (2002), 'Ras-inducible immortalized fibroblasts: focus formation without cell cycle deregulation', *Oncogene*, 21 (19), 3058-67.
- Keeney, S., Giroux, C. N., and Kleckner, N. (1997), 'Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family', *Cell*, 88 (3), 375-84.
- Kitajima, T. S., et al. (2003), 'Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast', *EMBO J*, 22 (20), 5643-53.
- Kneitz, B., et al. (2000), 'MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice', *Genes Dev*, 14 (9), 1085-97.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005), 'On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint', *Nat Rev Cancer*, 5 (10), 773-85.
- Krasinska, L., et al. (2007), 'Regulation of multiple cell cycle events by Cdc14 homologues in vertebrates', *Exp Cell Res*, 313 (6), 1225-39.
- Laoukili, J., et al. (2005), 'FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability', *Nat Cell Biol*, 7 (2), 126-36.
- Li, L., Ljungman, M., and Dixon, J. E. (2000), 'The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53', *J Biol Chem*, 275 (4), 2410-4.
- Lim, H. H., Goh, P. Y., and Surana, U. (1998), 'Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast', *Curr Biol*, 8 (4), 231-4.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R. H. (2009), 'The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network', *J Cell Biol*, 185 (2), 193-202.
- Lindqvist, A., et al. (2005), 'Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome', *J Cell Biol*, 171 (1), 35-45.
- Lipkin, S. M., et al. (2002), 'Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice', *Nat Genet*, 31 (4), 385-90.

- Liu, D., Liao, C., and Wolgemuth, D. J. (2000), 'A role for cyclin A1 in the activation of MPF and G2-M transition during meiosis of male germ cells in mice', *Dev Biol*, 224 (2), 388-400.
- Liu, D., et al. (1998), 'Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse', *Nat Genet*, 20 (4), 377-80.
- Llano, E., et al. (2008), 'Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice', *Genes Dev*, 22 (17), 2400-13.
- Lydall, D., et al. (1996), 'A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes', *Nature*, 383 (6603), 840-3.
- Lyon, M. F. and Hawker, S. G. (1973), 'Reproductive lifespan in irradiated and unirradiated chromosomally XO mice', *Genet Res*, 21 (2), 185-94.
- Machin, F., et al. (2006), 'Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction', *J Cell Biol*, 173 (6), 893-903.
- Mailand, N., et al. (2002), 'Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation', *Nat Cell Biol*, 4 (4), 317-22.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001), 'To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer', *Nat Rev Cancer*, 1 (3), 222-31.
- Malumbres, M. and Carnero, A. (2003), 'Cell cycle deregulation: a common motif in cancer', *Prog Cell Cycle Res*, 5, 5-18.
- Manchado, E., et al. (2010), 'Targeting Mitotic Exit Leads to Tumor Regression In Vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55alpha,delta Phosphatase', *Cancer Cell*, 18 (6), 641-54.
- Manning, G., et al. (2002), 'The protein kinase complement of the human genome', *Science*, 298 (5600), 1912-34.
- Masui, Y. and Markert, C. L. (1971), 'Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes', *J Exp Zool*, 177 (2), 129-45.
- Matzuk, M. M. and Lamb, D. J. (2008), 'The biology of infertility: research advances and clinical challenges', *Nat Med*, 14 (11), 1197-213.
- Mocciaro, A., et al. (2010), 'Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair', *J Cell Biol*, 189 (4), 631-9.
- Mochida, S. and Hunt, T. (2007), 'Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase', *Nature*, 449 (7160), 336-40.
- Mochida, S., et al. (2009), 'Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts', *EMBO J*, 28 (18), 2777-85.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007), 'The spindle-assembly checkpoint in space and time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (5), 379-93.
- Nakayama, K. I. and Nakayama, K. (2006), 'Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer', *Nat Rev Cancer*, 6 (5), 369-81.
- Nalepa, G. and Harper, J. W. (2004), 'Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells', *Cell Motil Cytoskeleton*, 59 (2), 94-108.
- Nguyen, T. B., et al. (2002), 'Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin', *J Biol Chem*, 277 (44), 41960-9.
- Nigg, E. A. (2001), 'Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (1), 21-32.

- Nigg, E. A., Blangy, A., and Lane, H. A. (1996), 'Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation', *Exp Cell Res*, 229 (2), 174-80.
- North, B. J. and Verdin, E. (2007), 'Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation', *J Biol Chem*, 282 (27), 19546-55.
- O'Connell, M. J., Krien, M. J., and Hunter, T. (2003), 'Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control', *Trends Cell Biol*, 13 (5), 221-8.
- O'Farrell, P. H. (2001), 'Triggering the all-or-nothing switch into mitosis', *Trends Cell Biol*, 11 (12), 512-9.
- Odorisio, T., et al. (1998), 'The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis', *Nat Genet*, 18 (3), 257-61.
- Ofir, Y., et al. (2004), 'The role and regulation of the preRC component Cdc6 in the initiation of premeiotic DNA replication', *Mol Biol Cell*, 15 (5), 2230-42.
- Ortega, S., et al. (2003), 'Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice', *Nat Genet*, 35 (1), 25-31.
- Pardee, A. B. (1974), 'A restriction point for control of normal animal cell proliferation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (4), 1286-90.
- Pawlak, G. and Helfman, D. M. (2002), 'Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts', *Mol Biol Cell*, 13 (1), 336-47.
- Perez de Castro, I., de Carcer, G., and Malumbres, M. (2007), 'A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy', *Carcinogenesis*, 28 (5), 899-912.
- Peter, M., et al. (1991), 'Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase', *EMBO J*, 10 (6), 1535-44.
- Peters, J. M. (2006), 'The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (9), 644-56.
- Queralt, E. and Uhlmann, F. (2008), 'Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit', *Curr Opin Cell Biol*, 20 (6), 661-8.
- Rhee, K. and Wolgemuth, D. J. (1995), 'Cdk family genes are expressed not only in dividing but also in terminally differentiated mouse germ cells, suggesting their possible function during both cell division and differentiation', *Dev Dyn*, 204 (4), 406-20.
- Ridley, A. J. and Hall, A. (1992), 'The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors', *Cell*, 70 (3), 389-99.
- Rodier, G., et al. (2008), 'Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase', *EMBO J*, 27 (4), 679-91.
- Rodriguez-Viciano, P., et al. (1997), 'Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras', *Cell*, 89 (3), 457-67.
- Roeder, G. S. and Bailis, J. M. (2000), 'The pachytene checkpoint', *Trends Genet*, 16 (9), 395-403.
- Roig, I., et al. (2010), 'Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis', *PLoS Genet*, 6 (8).
- Rosso, L., et al. (2008), 'Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein', *PLoS Biol*, 6 (6), e140.

- San-Segundo, P. A. and Roeder, G. S. (1999), 'Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control', *Cell*, 97 (3), 313-24.
- Schindler, K. and Schultz, R. M. (2009), 'CDC14B acts through FZR1 (CDH1) to prevent meiotic maturation of mouse oocytes', *Biol Reprod*, 80 (4), 795-803.
- Schmitz, M. H., et al. (2010), 'Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells', *Nat Cell Biol*, 12 (9), 886-93.
- Seki, A., et al. (2008), 'Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry', *Science*, 320 (5883), 1655-8.
- Seong, Y. S., et al. (2002), 'A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells', *J Biol Chem*, 277 (35), 32282-93.
- Serrano, M., et al. (1996), 'Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality', *Cell*, 85 (1), 27-37.
- Skoufias, D. A., et al. (2007), 'Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed', *J Cell Biol*, 179 (4), 671-85.
- Solomon, M. J., et al. (1990), 'Cyclin activation of p34cdc2', *Cell*, 63 (5), 1013-24.
- Stegmeier, F. and Amon, A. (2004), 'Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation', *Annu Rev Genet*, 38, 203-32.
- Stemmann, O., et al. (2001), 'Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase', *Cell*, 107 (6), 715-26.
- Sullivan, M. and Morgan, D. O. (2007), 'Finishing mitosis, one step at a time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11), 894-903.
- Sun, F. and Handel, M. A. (2008), 'Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes', *Chromosoma*, 117 (5), 471-85.
- Sun, F., et al. (2008a), 'The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm', *Hum Reprod*, 23 (8), 1691-7.
- Sun, F., et al. (2008b), 'Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia', *Mol Hum Reprod*, 14 (7), 399-404.
- Tanguay, P. L., Rodier, G., and Meloche, S. (2010), 'C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis', *Biochem J*, 428 (1), 103-11.
- Toyoshima-Morimoto, F., et al. (2001), 'Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase', *Nature*, 410 (6825), 215-20.
- Trautmann, S., et al. (2001), 'Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression', *Curr Biol*, 11 (12), 931-40.
- Trinkle-Mulcahy, L. and Lamond, A. I. (2006), 'Mitotic phosphatases: no longer silent partners', *Curr Opin Cell Biol*, 18 (6), 623-31.
- Tung, K. S., Hong, E. J., and Roeder, G. S. (2000), 'The pachytene checkpoint prevents accumulation and phosphorylation of the meiosis-specific transcription factor Ndt80', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (22), 12187-92.
- Ueda, M., et al. (1997), 'Centrosome positioning and directionality of cell movements', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (18), 9674-8.

- van de Weerd, B. C. and Medema, R. H. (2006), 'Polo-like kinases: a team in control of the division', *Cell Cycle*, 5 (8), 853-64.
- Vazquez-Novelle, M. D., et al. (2005), 'Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases', *J Biol Chem*, 280 (32), 29144-50.
- Vazquez-Novelle, M. D., et al. (2010), 'Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B', *J Biol Chem*.
- Viera, A., et al. (2009), 'CDK2 is required for proper homologous pairing, recombination and sex-body formation during male mouse meiosis', *J Cell Sci*, 122 (Pt 12), 2149-59.
- Vigneron, S., et al. (2009), 'Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A', *EMBO J*, 28 (18), 2786-93.
- Visintin, R., et al. (1998), 'The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation', *Mol Cell*, 2 (6), 709-18.
- Watanabe, N., et al. (2004), 'M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (13), 4419-24.
- Wiltshire, T., et al. (1995), 'Induced premature G2/M-phase transition in pachytene spermatocytes includes events unique to meiosis', *Dev Biol*, 169 (2), 557-67.
- Wolgemuth, D. J., Laurion, E., and Lele, K. M. (2002), 'Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line', *Recent Prog Horm Res*, 57, 75-101.
- Wu, J., et al. (2008), 'Cdc14B depletion leads to centriole amplification, and its overexpression prevents unscheduled centriole duplication', *J Cell Biol*, 181 (3), 475-83.
- Wu, J. Q., et al. (2009), 'PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation', *Nat Cell Biol*, 11 (5), 644-51.
- Xu, X., et al. (2003), 'Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice', *Development*, 130 (9), 2001-12.
- Xu, Y., et al. (1996), 'Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma', *Genes Dev*, 10 (19), 2411-22.
- Yan, W. (2009), 'Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts', *Mol Cell Endocrinol*, 306 (1-2), 24-32.
- Yoshida, K., et al. (1998), 'The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis', *Mol Cell*, 1 (5), 707-18.
- Yuan, L., et al. (2000), 'The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility', *Mol Cell*, 5 (1), 73-83.
- Zhao, Y., et al. (2008), 'Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase', *Mol Biol Cell*, 19 (4), 1317-27.
- Zhong, C., Kinch, M. S., and Burrridge, K. (1997), 'Rho-stimulated contractility contributes to the fibroblastic phenotype of Ras-transformed epithelial cells', *Mol Biol Cell*, 8 (11), 2329-44.
- Zondag, G. C., et al. (2000), 'Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition', *J Cell Biol*, 149 (4), 775-82.



Anexos

